Biomechanische Untersuchungen an humanen allogenen Sehnentransplantaten nach Elektronenstrahl-und Gammabestrahlung

vorgelegt
von Diplom-Naturwissenschaftler
Salahedeen Keshlaf
aus Zawia, Libyen

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin - Institut für Biotechnologie
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing F. Methner
Gutachter: Prof. Dr. rer.nat. R. Lauster
Gutachter: Prof. Dr. med. A. Pruß
Gutachter: Prof. Dr.-Ing. L. Garbe

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.01.2012

Berlin 2012
D 83

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1
1.1 Physiologie des vorderen Kreuzbandes 1
1.1.1 Zelluläre Bestandteile 1
1.1.2 Extrazellulärmatrix 2
1.1.3 Funktion des vorderen Kreuzbandes 3
1.2 Therapieoptionen bei Ruptur des vorderen Kreuzbandes 4
1.2.1 Epidemiologie 4
1.2.2 Behandlungsstrategien 5
1.2.2.1 Historischer Abriss operativer Methoden der VKB-Ruptur 5
1.2.2.2 Autologe Transplantate als VKB-Ersatz 6
1.2.2.3 Spendertransplantate (Allografts) als VKB-Ersatz 8
1.3 Biologisch-biomechanische Charakterisierung von Auto- bzw. Allografts 9
1.3.1 Biologischer Umbau (Remodeling) 9
1.3.2 Biomechanische Eigenschaften 11
1.4 Anforderungen an die Herstellung von VKB-Allografts 13
1.4.1 Infektionsrisiko allogener muskuloskelettaler Gewebetransplantate 13
1.4.1.1 Virusübertragungen 13
1.4.1.2 Übertragungen von Bakterien 15
1.4.2 Sterilisationsverfahren für muskuloskelettale Allografts 15
1.4.2.1 Peressigsäure-Ethanol (PES) 16
1.4.2.2 Thermodesinfektion 17
1.4.2.3 Tutoplast®-Sterilistion 17
1.4.2.4 Bestrahlung 17
1.4.2.4.1 Gammastrahlen-Sterilisation 19
1.4.2.4.2 Elektronenstrahlen-Sterilisation 21
1.5 Ziel der Untersuchungen 22
1.6 Problemstellung und Hypothesen 22

2. MATERIAL UND METHODEN 25
2.1 Sehnentransplantate 25
2.2 Studiengruppen 27

2.3 Bestrahlung der BPTB-Transplantate 28
2.3.1 Gammabestrahlung 29
2.3.2 10-MeV-Elektronenbestrahlung (E-Beam) 30
2.4 Methodik der biomechanischen Untersuchungen 31
2.4.1 Einbettungen der Sehnentransplantate 32
2.4.2 Testablauf 33
2.4.2.1 Optische Messsysteme 35
2.4.2.2 Räumliche Messanordnungen und Kalibrierung 36
2.5 Tierexperimentelle Untersuchungen 37
2.5.1 Studiendesign 37
2.5.2 Versuchstiere 38
2.5.3 Tiermodell Schaf 38
2.5.4 Transplantatauswahl 39
2.5.5 Transplantatvorbehandlungen 39
2.5.6 Operationen 40
2.5.6.1 Prämedikation, Narkose und Analgesie 40
2.5.6.2 Transplantatentnahme 40
2.5.6.3 Präparation 41
2.5.6.4 Arthrotomie und Transplantatverankerung 41
2.5.6.5 Postoperative Nachsorge 44
2.5.6.6 Transplantatentnahme 44
2.5.7 Biomechanische Testung 45
2.5.7.1 Versuchsaufbau 45
2.5.7.2 Test-Protokoll 46
2.6 Statistische Analysen 48

3. ERGEBNISSE 49
3.1 Dosisabhängige Biomechanik nach E-Beam-Sterilisation 49
3.1.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft 49
3.1.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklischen Elongation 50
3.2 E-Beam- vs. Gammabestrahlung (15-25 kGy) 51
3.2.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft 52
3.2.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklischen Elongation 53
3.3 E-Beam- (34 kGy) vs. Gammabestrahlung (34 kGy) 55
3.3.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft 55
3.3.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklischen Elongation 56
3.4 Fraktionierte E-Beam-Sterilisation 57
3.4.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft 57
3.4.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklischen Elongation 59
3.5 Tierexperimentelle Ergebnisse 60
3.5.1 E-Beam-Allograft nach 6 Wochen 61
3.5.2 E-Beam-Allograft nach 12 Wochen 61

4. DISKUSSION 64
4.1 Allogene Sehnentransplantate 64
4.2 Bestrahlung von Sehnengewebe 66
4.2.1 Gammabestrahlung 66
4.2.2 E-Beam-Bestrahlung 66
4.3 Gamma- vs. E-Beam-Bestrahlung von Sehnenallografts 67
4.3.1 E-Beam-Sterilisation 15, 25 und 34 kGy 67
4.3.2 E-Beam- vs. Gamma-Sterilisation 25 kGy 68
4.3.3 E-Beam- vs. Gamma-Sterilisation 34 kGy 69
4.3.4 Fraktionierte E-Beam-Sterilisation vs. E-Beam- und Gamma-Einzeldosis (34 kGy) 70
4.3.5 Tierexperimentelle Untersuchungen – 34 kGy E-Beam 71
4.3.5.1 Biomechanische Ergebnisse 72
4.3.5.2 Histologie 73

5. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN……...75

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS..... 77

7. LITERATURVERZEICHNIS 79

ANHANG 97
Nomenklatur 97
Danksagung..... 99
Publikationen des Promovenden..... 100
Eidesstattliche Erklärung 101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Kniegelenks 1
Abbildung 2: Aufbau und Struktur von Sehnen und Bändern 2
Abbildung 3: Native Flexorsehne im polarisierten Licht 3
Abbildung 4: Autologe Entnahme von Patellar- und Hamstringsehnen als VKB-Ersatz 7
Abbildung 5: Kraft-Strecke-Hysteresekurve beim Versagenstest 12
Abbildung 6: Prinzip der Freisetzung von Gammastrahlen 19
Abbildung 7: Humanes BPTB-Präparat nach Entnahme und Aufbereitung für Sterilisation .. 25
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Verpackung nach Füllung mit CO_2 26
Abbildung 9: Inertisierung mit Kohlendioxid 27
Abbildung 10: In-vitro-Untersuchungsgruppen 28
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Anlage GS 3000 30
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Anlage GSE 80 31
Abbildung 13: Zwick-Materialprüfmaschine Typ 1455 u. Aufbau der optischen Kameras 32
Abbildung 14: Eingebettetes BPTB-Transplantat 33
Abbildung 15: Graphische Darstellung des Testablaufs 34
Abbildung 16: Befestigung der Marker an den BPTB-Präparaten 35
Abbildung 17: Optisches 3D-Messsystem 35
Abbildung 18: Schema der Kameraposition in Relation zum Testobjekt 36
Abbildung 19: Übersicht der hinteren Extremität des Schafes 39
Abbildung 20: Transplantat in Baseball-stitch-Technik präpariert 41
Abbildung 21: a) anteromediale Arthrotomie; b) debridierte Insertionstelle des VKB; c) Bohrung des femoralen Knochentunnels; d) Bohrung des tibialen Knochentunnels; e) femorale Verankerung mit einem Endobutton; f) und g) Einziehen des Transplantates; h) tibiale Verankerung über eine Knochenbrücke 42
Abbildung 22: Indirekte Transplantatfixation distal mittels Knochenbrücke und proximal über einen Endobutton 43
Abbildung 23: Modifizierter Schubladentest beim Schaf in 60°-Flexion 46
Abbildung 24: Testanlage für den Versagenstest 48
Abbildung 25: Steifigkeit [N/mm] 50
Abbildung 26: Maximale Versagenkraft [N] 50
Abbildung 27: Strain [%] 51

Abbildung 28: Zyklische Elongation [mm] 51
Abbildung 29 Steifigkeit [N/mm]: 53
Abbildung 30: Maximale Versagenkraft [N] 53
Abbildung 31: Strain [%] 54
Abbildung 32: Zyklische Elongation [mm] 54
Abbildung 33: Steifigkeit [N/mm] 56
Abbildung 34: Maximale Versagenkraft [N] 56
Abbildung 35: Strain [%] 57
Abbildung 36: Zyklische Elongation [mm] 57
Abbildung 37: Steifigkeit [N/mm] 59
Abbildung 38: Maximale Versagenkraft [N] 59
Abbildung 39: Strain [%] 60
Abbildung 40: Zyklische Elongation [mm] 60
Abbildung 41: Vergleich Steifigkeit nach E-Beam,Allograft,Autograft und nativ auf 6 und 12 Wochen 62
Abbildung 42: Vergleich Maximalen Versagenkraft nach E-Beam,Allograft,Autograft und nativ auf 6 und 12 Wochen 62
Abbildung 43: Vergleich der AP-Laxizität nach E-Beam,Allograft,Autograft und nativ auf 6 und 12 Wochen 63
Abbildung 44: Gesamtzellzahl 74
Abbildung 45: Gefäßdichte 74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HIV-, HCV-, HBV-Übertragungen durch muskuloskelettales Gewebe und Haut . 14
Tabelle 2: D_{10}-Werte (kGy) für eminent-pathogene Viren, Bakterien und Pilze..... 19
Tabelle 3: Postoperative Standzeiten der E-Beam-Allografts, Autografts und VKB nativ 37
Tabelle 4: Steifigkeit und maximale Versagenskraft der BPTB–Transplantate 50
Tabelle 5: Strain und zyklischen Elongation der BPTB-Transplantate 51
Tabelle 6: Steifigkeit und max. Versagenskraft E-Beam- vs. Gammabestrahlung..... 52
Tabelle 7: Strain und zyklischen Elongation der BPTB-Transplantate 54
Tabelle 8: Steifigkeit und max. Versagenskraft 34 kGy E-Beam vs. Gamma 55
Tabelle 9: Strain und zyklische Elongation BPTB-Transplantate 56
Tabelle 10: Steifigkeit und maximale Versagenskraft der BPTB-Transplantate 58
Tabelle 11: Strain und zyklischen Elongation der BPTB-Transplantate 60
Tabelle 12: Biomechanische Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 6 Wochen 61
Tabelle 13: Biomechanische Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 12 Wochen 62

1. Einleitung

1.1 Physiologie des vorderen Kreuzbandes

Das Kniegelenk und dessen Bänder (Abb.1) sind im täglichen Leben und besonders bei sportlichen Aktivitäten teilweise extremen Belastungen ausgesetzt. Dies gilt sowohl für statische Situationen (Stehen, Knien), als auch für dynamische Abläufe wie Gehen, Laufen, Springen oder Treppensteigen. Die Kraftübertragung und die Stabilisierung des Gelenkes erfolgt über Muskeln, Sehnen, Bänder und die Menisken. Die Kreuzbänder besitzen eine herausragende Bedeutung für die zentrale Stabilisierung des Kniegelenkes und entwickeln sich während der Embryogenese aus dem Synovialmesenchym zwischen Femur- und Tibiaanlage (Pelttari et al., 2006; Welle et al., 2007).

1.1.1 Zelluläre Bestandteile

Die in Bändern und Sehnen vor allem vorkommenden Zellen sind Fibroblasten, deren Form je nach Aktivitätszustand von spindelförmig (Fibrozyten, wenig aktiv) bis ovoid (Fibroblasten, hohe Aktivität) variieren kann. Sie sind aktiv an der Synthese und den resorptiven Prozessen der Extrazellulärsubstanz beteiligt und liegen perlschnurartig zwischen den longitudinal orientierten kollagenen Fasern. Weitere Zellen des VKB sind im tibianahen Bereich chondroide Zellen sowie Leukozyten, Mastzellen, Makrophagen und Plasmazellen, deren Hauptaufgabe in der Immunabwehr liegt (Petersen und Tillmann et al., 1999)

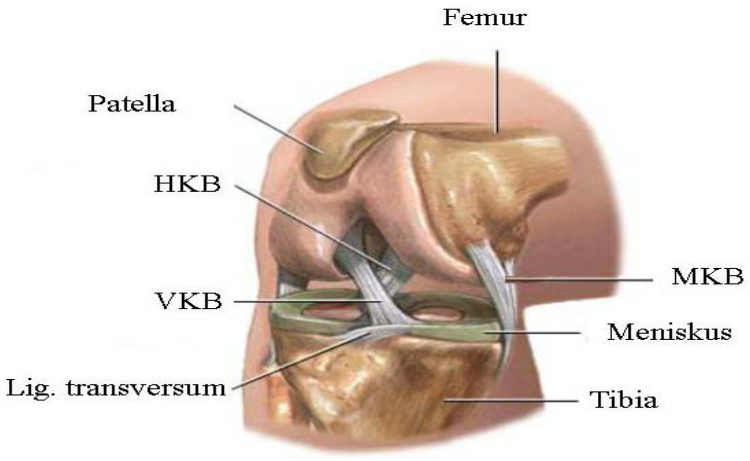


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Kniegelenks Aus: Medline plus Health Information,Medical Encyclopedia, Knee Arthroscopy-Normal anatomy; http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100117_1.htm

1.1.2 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix (EZM) oder Interzellularsubstanz besteht aus Grundsubstanz und Bindegewebsfasern. Beide werden von Fibroblasten synthetisiert. Die Grundsubstanzen sind nichtfibrilläre, lichtmikroskopisch amorphe Bestandteile wie interstitielle Flüssigkeit, Proteoglycane und Glycoproteine. Sie haben metabolische Funktionen und steuern über die Exprimierung von Integrinen die Fibrillogenese (Junqueira et al., 2005). Die Bindegewebsfasern des Band- und Sehnengewebes bestehen aus kollagenen, retikulären und elastischen Fasern, wobei der Anteil von Kollagenfasern mit 75 % des Trockengewichtes überwiegt. 90 % des Kollagens besteht aus Kollagen Typ I und 10 % aus Kollagen Typ III (Petersen und Zantop, 2009; Petersen und Tillmann, 1999; Yasuda und Hayashi, 1997). Kollagen I sichert eine hohe Zugfestigkeit des Gewebes, während Kollagen III durch viskoelastische Eigenschaften die repetitive Belastung ohne Ermüdungsschäden der Kreuzbänder und die unterschiedliche Ausrichtung der Faserbündel während der Bewegung ermöglicht (Petersen und Tillmann, 2002). Die Bildung des Kollagens erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 2).

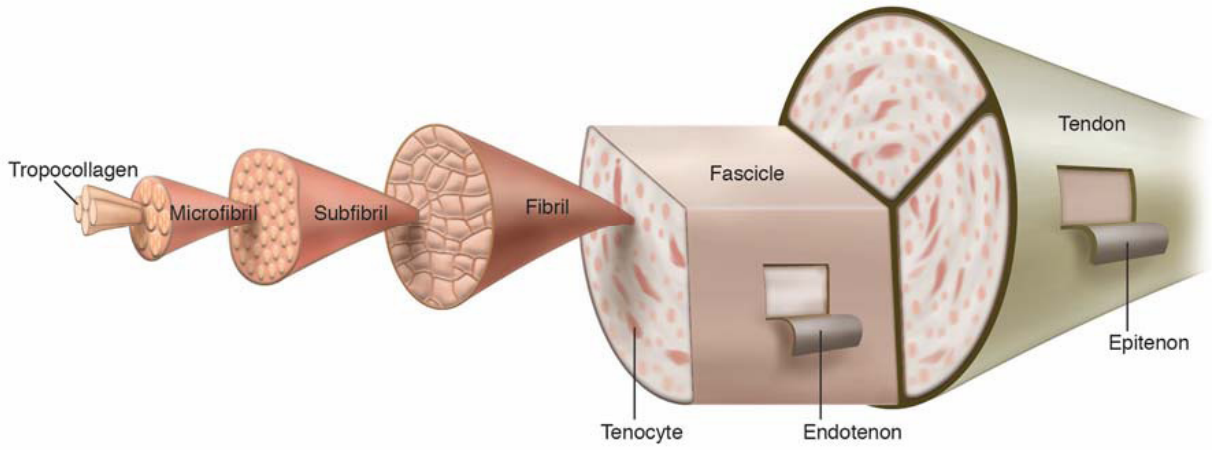


Abbildung 2: Aufbau und Struktur von Sehnen und Bändern (aus: Towler u. Gelbermann, 2006)

Fibroblasten synthetisieren Polypeptidketten (α-Helices), die intrazellulär zu einer Tripelhelix verdrillt werden. Dieses Prokollagen wird aus den Fibroblasten abgegeben und durch Peptidabspaltung entsteht extrazellulär Tropokollagen. Durch Quervernetzungen des Tropokollagens bilden sich Mikrofibrillen (20-200 nm Durchmesser). Diese lagern sich in der Grundsubstanz zu Kollagenfibrillen (0,3 – 0,5 µm Durchmesser) und schließlich zu

Kollagenfasern (1-20 µm) zusammen. Die Kollagenfasern haben in Faserrichtung einen longitudinal gewellten Verlauf, der eine gewisse Dehnung des Gewebes zulässt und Grundlage der Elastizität von Sehnen und Bändern ist. Diese für die jeweiligen Bänder und Sehnen typische Wellenstruktur wird als Crimp bezeichnet (Abb.3). Die Kollagenfasern werden schließlich zu Kollagenfaserbündeln zusammengefasst. Die Länge der Kollagenfaserbündel wird durch den Spannungszustand beeinflusst. So verkürzen sie sich z.B. bei längerer Ruhigstellung und verlängern sich bei anhaltend hoher Belastung und Dehnung (Sakane et al., 1997). Die Kollagenwellenlänge oder Crimp lässt sich messen und zeigt charakteristische Änderungen im Rahmen des frühen Bandumbaus des vorderen Kreuzbandersatzes. Dadurch ist diese ein etablierter Parameter in der Analyse des Remodelingprozesses der extrazellulären Matrix (Daniel und Akeson, 1990; Tackman, 1994; Yasuda und Hayashi, 1997; Junqueira et al., 2005).

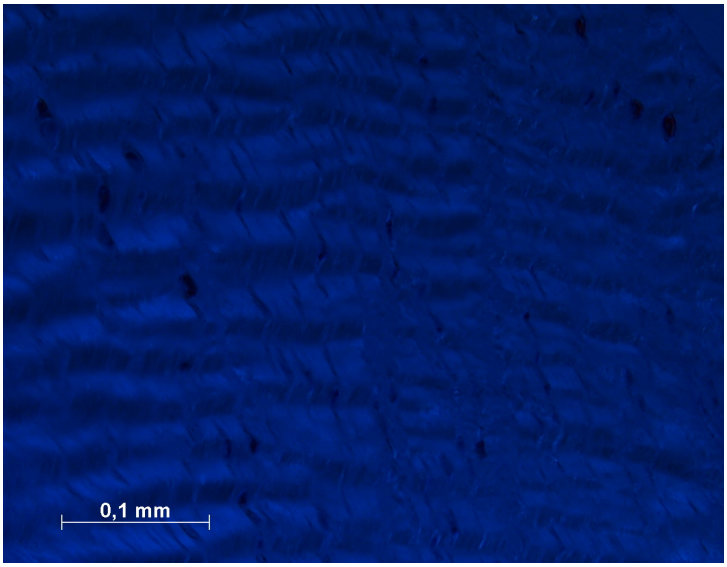


Abbildung 3: Native Flexorsehne im polarisierten Licht (20 x) (Quelle: persönliche Überlassung von Christine Broziat, CMSC Berlin)

1.1.3 Funktion des vorderen Kreuzbandes

Die wichtigste Funktion des VKB ist die Stabilisierung des Kniegelenks bei anterioren bzw. posterioren Translationsbewegungen der Tibia bzw. des Femurs (Sakane et al., 1997). Dabei verändern sich die scherengitterartig angeordneten Fasern des Bandes in Abhängigkeit von Geschwindigkeit und Stärke der Unter- und Oberschenkelbewegungen nicht linear, sondern exponentiell. Bei schneller Stoßbelastung ist das VKB stärker gestrafft als bei einem

langsamen Belastungsanstieg. Die zwei Faserbündelkomponenten im VKB üben bei Beugung und Streckung des Kniegelenks unterschiedliche Stabilisierungsfunktionen aus. Während das anteromediale Bündel vorwiegend die antero-posterioren Translationsbewegungen der Tibia stabilisiert, strafft sich das postero-laterale Bündel und stabilisiert damit in der Endphase der Streckung die Schlussrotation im Kniegelenk. Dieser komplizierte Aufbau des VKB setzt an alle Ersatzversuche höchste Anforderungen.

1.2 Therapieoptionen bei Ruptur des vorderen Kreuzbandes

1.2.1 Epidemiologie

Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes (VKB) ist die häufigste Bandläsion des Kniegelenks und rangiert ursächlich an erster Stelle hinsichtlich klinisch relevanter Knieverletzungen (Johnson et al., 1992). Verlässliche Zahlen über die Inzidenzrate von Rupturen des VKB liegen in der Literatur nur für einige Länder vor. Die geschätzte Häufigkeit wurde in den letzten Jahren mit 1: 1000 bis 1: 3500 Einwohner pro Jahr in Industriestaaten angegeben, wobei insbesondere Sportverletzungen als Ursache für die Ruptur genannt werden (Miyasaka et al., 1991; Rupp et al., 2002).

Die Überdehnung des VKB mit der Gefahr der Ruptur ereignet sich in der Mehrzahl der Fälle durch ein Valgus–Rotationstrauma. Dabei ist der Unterschenkel fixiert oder wurde gestoppt und der Oberkörper befindet sich in einer Rotationsbewegung oder wird bei Fixation des Unterschenkels plötzlich abgebremst. Zu den Sportarten mit der höchsten Gefährdung zählen sog. „Stop-and-Go“- Disziplinen wie z.B. Handball, Basketball und Fußball sowie alpiner Skisport und Skateboard. In der Schweiz treten 50% aller Rupturen des VKB bei Fußball und alpinem Skisport auf (Gesundheitsdirektion Zürich, 2009).

In den Vereinigten Staaten von Amerika werden jedes Jahr etwa 80.000 bis 100.000 Rupturen des VKB registriert (Griffin et al., 2000; Huston et al., 2000). Die aus den vorwiegend operativen Behandlungen und der Nachsorge entstehenden Kosten liegen in den USA jährlich bei ungefähr einer Milliarde Dollar (Griffin et al., 2000). In den USA ereignen sich 70% aller Läsionen des VKB zwischen dem 15. bis 45. Lebensjahr. Für diese Altersgruppe beträgt die Häufigkeit 1:1750 und für die Altersgruppe 25 – 45 Jahre 1:1000 (Petersen und Zantop, 2009). In Deutschland ist die Kreuzbandersatzplastik mit ca. 50.000 Operationen pro Jahr die

am häufigsten durchgeführte bandplastische Operation am Bewegungsapparat und hat dementsprechend eine erhebliche volkswirtschaftliche Bedeutung bekommen (Weiler et al., 2002c). 2002 betrugen die Krankheitskosten in Deutschland für therapeutische Eingriffe am VKB ca. 359,3 Millionen € (Statistisches Bundesamt, 2002).

1.2.2 Behandlungsstrategien

Da das VKB die übermäßige Auslenkung des Kniegelenks nach anterior sowie die Kniegelenksrotation verhindert, führt eine Verletzung zur Knieinstabilität und im späteren Verlauf zu einem deutlich erhöhten Risiko sekundärer Meniskus- und Gelenkknorpelschädigungen sowie zu einem erhöhten Arthroserisiko (Bonamo et al.,1990; Andersson et al.,1991; Beynnon et al., 2002; Hinterwimmer et al., 2003). Konsens besteht heute darüber, dass, wenn keine Kontraindikationen vorliegen, das rupturierte VKB bei mobilen Patienten operativ versorgt wird (Menke et al., 1990; Andersson et al., 1991; Yasuda et al., 1995). Kontraindikationen für eine Operation sind die allgemeine (ASA 3-4) oder lokale Inoperabilität (z.B. infizierter Hämarthros im Kniegelenk). Zu den relativen Kontraindikationen und damit für die Entscheidung zu konservativen Behandlungsmaßnahmen bei isolierter Läsion des VKB zählen Orthopäden und Unfallchirurgen die minimale Kniegelenkinstabilität, d.h. eine minimale Lachman-Differenz und einen negativen Pivon-Shift (AWMF, 2005) geringe Sport- und Bewegungsambitionen, eine vorbestehende Arthrose, eine kernspintomografisch nachgewiesene Partialruptur des VKB sowie ein erhöhtes Narkose- und Operationsrisiko. Für die operative Versorgung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

1.2.2.1 Historischer Abriss operativer Methoden der VKB-Ruptur

Die erste konservative Behandlung verletzter vorderer Kreuzbänder mit einem Beingips erfolgte 1850 durch den Briten *Stark* (Stark, 1850). 1895 erfolgte die erste primäre Naht der Kreuzbänder und 8 Jahre später wurde über 4 Fälle berichtet (Mayo-Robson, 1903). Mayo-Robson verwendete Catgut als Nahtmaterial bei einem Patienten, der sich eine Ruptur des vorderen und hinteren Kreuzbandes zugezogen hatte. Zunächst war die primäre Naht bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts die Methode der Wahl, auch wenn bis dahin keine Nachuntersuchungen mit Spätergebnissen vorlagen. Eine 5-jährige postoperative Nachbeobachtungsstudie aus dem Jahr 1976 mit sehr negativen Ergebnissen nach Kreuzbandnaht und weitere Studien mit denselben Resultaten leiteten das Ende dieser

Operationstechnik ein (Feagin und Curl, 1976; Odensten et al., 1984; Engebretsen et al., 1990). Aus diesem Grund, und parallel zur VKB-Naht, setzten verstärkt Bemühungen ein, das verletzte VKB durch artifizielle (nichtbiologisch), autologe (human, körpereigen), allogene (human, körperfremd) sowie xenogene (andere Spezies, körperfremd) Transplantate zu ersetzen (Marrale et al., 2007). Als artifizielle Materialien wurden Seide, Kohlenstofffasern, Polyester, Polypropylen und Gore-Tex verwendet. Der Einsatz dieser künstlichen Materialien konnte sich jedoch aufgrund schlechter klinischer Ergebnisse, bedingt vor allem durch therapieresistente Gelenkergüsse, nicht durchsetzen (Höher und Tiling, 2000). Klinische Versuche, das rupturierte VKB durch körpereigenes Sehnengewebe zu ersetzen, begannen 1914. Der russische Chirurg *Grekow* wählte dafür erstmals Fascia lata–Streifen (Hesse, 1914). 1935 folgten Rekonstruktionen mit Patellarsehnen und 1950 mit Sehnen der Mm. semitendinosus und gracilis (Wittek, 1935; Lindemann, 1950). 1963 inaugurierte Jones eine Rekonstruktion mit einem gestielten Transplantat des mittleren Drittels des Ligamentum patellae und 1966 entwickelte der Rostocker Unfallchirurg Brückner die BPTB-Technik, wie sie heute weltweit zum Einsatz kommt (Jones, 1963; Brückner, 1966; Rupp und Kohn, 2002).

1.2.2.2 Autologe Transplantate als VKB-Ersatz

Das autologe, freie Patellarsehnendrittel mit zwei Knochenblöcken war aufgrund seiner stabilen und schnellen Integration in den Knochen und der damit verbundenen hohen initialen Festigkeit in den letzten 20 Jahren die Methode der Wahl (Amiel et al., 1986; Petersen und Laprell, 2000; Fink et al., 2001). Als weitere autologe Ersatzplastik diente seit den 90er Jahren die Quadricepssehne mit einem ossären Anteil aus der Patella (Fulkerson und Langeland, 1996; Chen et al., 2006). Einschränkend ist zu erwähnen, dass diese Methode durch postoperative Probleme belastet wird, die durch die Entnahme der Transplantate bedingt sind. Ursachen für eine verzögerte Rekonvaleszenz sind Schwächung des Kniestreckapparates, Verkürzung der verbliebenen Patellarsehne mit postoperativem Streckdefizit, femoropatellare Schmerzen, Kniegelenkkrepitation, Bewegungseinschränkung sowie, in geringem Ausmaß, Patellafrakturen (Bonatus et al., 1991; Christen und Jakob, 1992; Jomha et al., 1999; Muellner et al., 1998; Aglietti et al., 1993; Engebretsen et al.,1990; Kartus et al., 1997).

Da die Elastizität der Patellarsehne gegenüber der des VKB geringer ist, setzen wegen der verlängerten Rekonvaleszenz, Orthopäden und Unfallchirurgen bei Leistungssportlern

bevorzugt autologe Ersatzsehnen aus dem Pes anserinus superficialis ein. Die vergleichsweise geringere Entnahmemorbiditat und sich ständig verbessernde Fixationstechniken haben inzwischen auch generell zu einer verstärkten Verwendung freier Sehnentransplantate, wie zum Beispiel der Sehnen des Pes anserinus (engl. hamstring), der Semitendinosus- und Gracilissehne geführt (Abb.4). Der M. semitendinosus bildet an der Medialseite des Kniegelenks, zusammen mit Sehnenanteilen des M. gracilis und des M. sartorius den an der Tibia fixierten sog. „Gänsefuß“ (Pes anserinus superficialis). Ist die Sehne des M. semitendinosus zu dünn, werden weitere Sehnenanteile des Pes anserinus superficialis (SGT-Technik) entnommen (Franz und Ulbrich, 2004; Steckel et al., 2007).

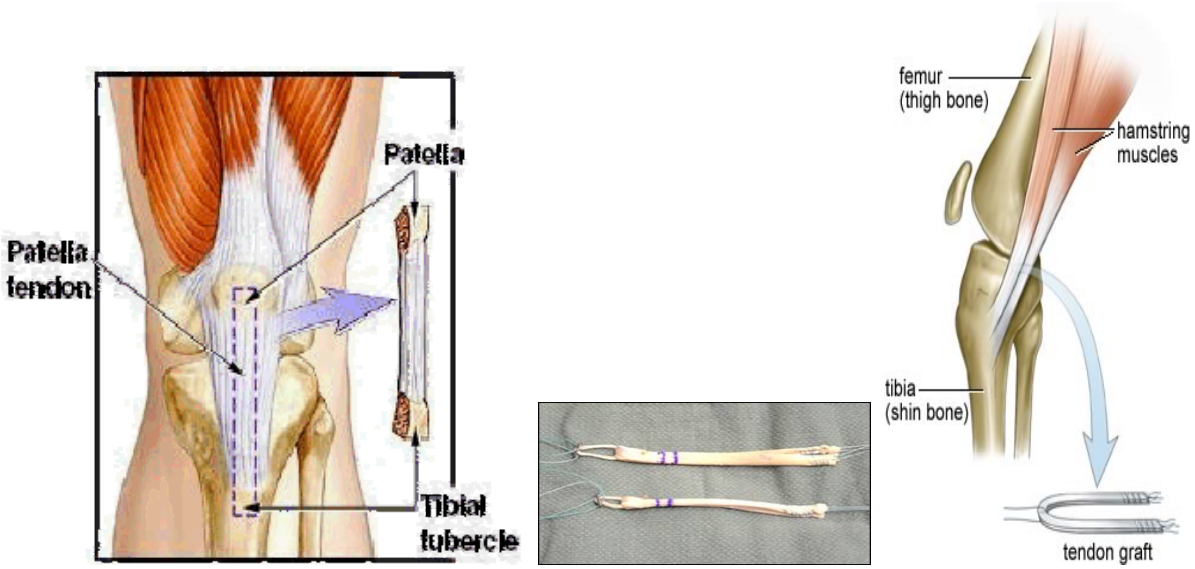


Abbildung 4: Autologe Entnahme von Patellar- und Hamstringsehnen als VKB-Ersatz
(Quelle: www.myknee.co.kr/info07)

Da aber alle diese autologen Operationstechniken des verletzten Kreuzbandes einen Entnahmepart beinhalten, ist auch bei autologen, freien Transplantaten eine zusätzliche Morbidität zu berücksichtigen. So wurde über postoperative Schwächungen des Beugeapparates (Hamstringsehnen) und Störungen der Innenrotation berichtet, die noch bis zu einem Jahr postoperativ bestehen können (Rosenberg et al., 1992; Rubinstein et al., 1994; Viola et al., 2000). Favorisiert und in der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie empfohlen, werden derzeit autologe Materialien entsprechend der BPTB- und SGT-Technik (AWMF, 2005).

1.2.2.3 Spendertransplantate (Allografts) als VKB-Ersatz

In zunehmendem Umfang wird, insbesondere in den USA, seit einigen Jahren allogenes Spendermaterial für Kreuzbandplastiken eingesetzt. Speziell für Revisionsoperationen und bei multiligamentären Verletzungen sind Allografts oft die einzige mögliche Option für eine Bandrekonstruktion, da körpereigene Sehnen zur operativen Versorgung nicht ausreichend zur Verfügung stehen (Vorlat et al., 1999). In den letzten Jahren hat die Verwendung von allogenem Material in den USA auch in der primären Rekonstruktion des VKB einen Anstieg von 30 – 50% erfahren (Goertzen et al., 1992; DiStefano, 1993; Vangsness, 2006). Der Vorteil liegt in der Vermeidung der durch die Entnahme von körpereigenen Sehnen möglichen Morbidität mit entsprechender Reduktion von Beschwerden und Funktionseinschränkung des Kniegelenkes im postoperativen Verlauf. Neben den bereits genannten BPTB- und STG-Rekonstruktionen werden als allogenes Spendermaterial auch Achilles-, Tibialis-anterior- und Quadricepssehnen, sowie Fascia-lata-Streifen verwendet (DeLay et al., 2001; Borden et al., 2001; Shelton et al., 2003; Almqvist et al., 2007; Gorschewsky et al., 2007). In den USA wurde im Jahr 2006 bei 20% aller VKB–Rekonstruktionen allogenes Spendermaterial eingesetzt (Suarez und Richmond, 2007). Nach einer Umfrage der Amerikanischen Orthopädischen Gesellschaft für Sportmedizin bejahten 86% der Ärzte den Einsatz von Allografts (Mc Allister et al., 2007).

In Deutschland und anderen europäischen Ländern ist der Anteil an Allografts in der Kreuzbandchirurgie mit 1 – 2% deutlich geringer (Mayr et al., 2007). Die Gründe dafür sind vielfältig und implizieren juristische, medizinische, ethische und logistische Einschränkungen und Bedenken. Mit der Umsetzung der EU-Richtlinien 2004/23/EC, 2006/17/EC und 2006/86/EC (European Council 2004, European Council 2006a, b) durch das neue Gewebegesetz vom 01.08.2007, bei dem allogene Gewebetransplantate auch in Deutschland einen Arzneimittelstatus erhielten (Bundes-gesetzblatt; 2007), wurde in juristischer und logistischer Hinsicht der Einsatz von Allografts erschwert. Daneben stehen im gegenwärtigen Stadium medizinische Bedenken weiterhin im Mittelpunkt der Forschung. Bis heute wird die optimale Transplantatwahl für die Rekonstruktion des rupturierten VKB hinsichtlich der Vor- oder Nachteile weltweit kontrovers diskutiert. Als Vorteile allogener Transplantate zum VKB-Ersatz werden die fehlende Entnahmemorbidität, eine Verkürzung der Operationszeit, die Reduktion postoperativer Schmerzen, der Erhalt der Integrität des Streck- und

Beugeapparates am Kniegelenk, besser dimensionierbare Transplantate und eine, im späteren Verlauf geringere Arthrofibroserate genannt (Kuhn et al., 2007; Cohen und Sekiya, 2007; Kustos et al., 2004). Protagonisten sehen in den Ergebnissen von Allografts gegenüber autologem Ersatz keine signifikanten Unterschiede in den biomechanischen Eigenschaften (Shino et al., 1984; 1991) und im postoperativen Verlauf und empfehlen daher auf Grund o.g. Vorteile die allogene Rekonstruktion (Shino et al., 1986; 1993; Peterson et al., 2001; Bach et al., 2005). Allerdings stehen diesen Vorteilen auch Bedenken gegenüber:

- Knochen-Sehnen-Transplantate (Patellarsehne) haben in einigen tierexperimentellen Studien bis 6 Monate postoperativ eine verzögerte Einheilung gezeigt (Jackson et al.,1993; Kirkpatrick et al., 1996),
- Allogene Transplantate zeigten vereinzelt immunologische Abstoßungsreaktionen, was zu einer Abnahme der Elastizität und damit zur Reruptur führen kann (Chang et al., 2003; Gorschewsky et al., 2005; Prodromos et al., 2007). Andererseits können Abstoßungsreaktionen durch vorheriges Tieffrieren der Transplantate vermieden werden, da dies zu einer Reduktion der für die Abstoßungsreaktion verantwortlichen Histokompatibilitätsantigene führt (Barad, 1982; Jackson et al., 1991).
- Das gravierendste Problem ist die Übertragung klinisch relevanter Infektionserreger vom Spender auf den Empfänger. Weiterführende Informationen hierzu werden in Kapitel 1.4.1 erläutert.

1.3 Biologisch-biomechanische Charakterisierung von Auto- bzw. Allografts

1.3.1 Biologischer Umbau (Remodeling)

Alle bisher verwendeten Sehnentransplantate weisen primär nicht dieselbe morphologische Textur des VKB auf, jedoch konnte in Tierversuchen der Nachweis erbracht werden, dass es zu einem Umbau der transplantierten Sehne zu einer dem ursprünglichen histologischen Aufbau des VKB sehr ähnelndem Struktur kommt. Dieser auch als Remodeling bezeichnete Umbau verläuft in 3 Phasen, die unter anderem von Bosch näher definiert wurden (Bosch und Kasperczyk, 1992). Die Autoren unterteilten in eine frühe Umbauphase (4 Wochen), eine Proliferations- und Vaskularisierungsphase (3 Monate) und eine Ligamentierungsphase (1 Jahr). Über die Dauer des Remodelingprozesses gibt es unterschiedliche Beobachtungen im Tiermodell. Für die Vorgänge im Menschen wird jedoch eine Dauer von 12 Monaten

postuliert (Weiler et al., 2001; 2002a). Sowohl autologe, wie auch allogene VBK–Ersatzplastiken im Tiermodell und beim Menschen weisen dieselben postoperativen Umbauvorgänge auf, wobei allogene Grafts eine zeitliche Verzögerung im Remodeling aufweisen (Jackson et al., 1996; Frank und Jackson, 1997; Woo et al., 1997; Scheffler et al., 2008; Dustmann et al., 2008).

In der frühen Umbauphase dominieren im, anfänglich avaskulären, Transplantat nekrotische Vorgänge. In dieser Zeit findet die Versorgung des Transplantates durch Diffusion aus der Umgebung, besonders des Hoffa´schen Fettkörpers statt. Darauf folgt von peripher nach zentral eine Invasion von Monozyten, Leukozyten und Makrophagen, die mit der Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verbunden ist. In diese Phase fällt auch der Beginn der Revaskularisierung mit der Einsprossung von Kapillaren aus einer neu gebildeten Synovialschicht und aus dem Hoffa´schen Fettkörper (Benedetto und Klima, 1986; Hoffmann et al., 1993). Die Folge ist ein Anstieg der Zahl der Fibroblasten und Fibrozyten. Diese resorbieren durch Sekretion von Kollagenasen Strukturen der implantierten Transplantatsehnen und ersetzten sie durch ein neues Kollagengerüst. Die Zellen gelangen dabei zusammen mit dem Granulationsgewebe über die einwachsenden Blutgefäße in das Sehnengewebe (Awad et al., 2003; Vincenti et al., 1996). Das Transplantat besitzt jetzt, nach 6 – 8 Wochen, eine geringe Reißfestigkeit (Bosch et al., 1989). Ca. 3 Monate nach dem VKB – Ersatz nimmt der Zellgehalt im Kreuzband auf das Normalmaß ab und der Kollagengehalt steigt. Die neu gebildeten Kollagenfasern richten sich longitudinal aus und nach etwa einem Jahr postoperativ findet sich ein, dem originären VKB histologisch gleichendes Bandgewebe (Amiel et al., 1986). Studien zum Remodeling-Prozess beim Menschen gibt es kaum. Die Kenntnisse über den Heilverlauf basieren auf Einzelbiopsien bzw. einzelner Gewebeproben nach Reeingriffen. Es wird davon ausgegangen, dass das Remodeling beim Menschen bei autologen Transplantaten nach ca. einem Jahr abgeschlossen ist. Tierexperimentelle als auch humane Einzelbeobachtungen erbrachten Hinweise, dass der Ligamentisierungsprozess auch nach einem längeren Zeitraum noch nicht abgeschlossen ist. Weitere Tierexperimentelle Studien zum Remodeling allogener Transplantate fanden ein verzögert einsetzendes und nach einem Jahr nicht abgeschlossenes Remodelling vor. (Rougraff et al., 1993; Falconiero et al., 1998; Goradia et al., 2000, Malinin et al., 2002, Scheffler et al., 2008). Aus dem Wissen um die zeitlich divergierenden Umbauprozesse beider Transplantattypen haben sich für Kliniker

und Physiotherapeuten wesentliche Erkenntnisse bezüglich der postoperativen Nachbehandlung ergeben (Scheffler, 2010).

1.3.2 Biomechanische Eigenschaften

Eine entscheidende Voraussetzung, um die Eignung von autologen und allogenen Transplantaten als Ersatz für das rupturierte VKB zu testen, ist die Ermittlung ihrer biomechanischen Eigenschaften. Dafür existieren eine Reihe von Parametern und deren Bestimmungsmethoden:

- Steifigkeit – Ist das Maß für den Widerstand, den das VKB einer Zugkraft entgegensetzt (Claes, 1983).
- Zyklische Elongation (creep) – Ist die Kraft, bei der es zu einer Dehnung durch Mikrorupturen bis hin zur Ruptur kommt.
- Dehnungsunterschied (strain) – Dehnungsverhalten während zyklischer Belastungstests.
- Elongation – Irreversible Dehnung.
- Versagenslast – Dehnungskraft, bei der das VKB reißt, bzw. aus der ossären Ankerung gerissen wird.

Die lineare Steifigkeit dokumentiert die reversible Ausdehnung des VKB, gemessen in mm, auf Grund einer definierten Zugkraft, gemessen in N. Bei geringer Zugkraft (≤ 20 N) verläuft die Kurve im Kraft-Dehnungs-Diagramm flach und nicht linear (geringe Steifigkeit). Bei höherer Zugkraft (ab 200 – 400 N) ist die Dehnung pro Krafteinwirkung geringer (hohe Steifigkeit), aber konstant. Die Längenänderungen des Transplantates bleiben reversibel nach Entlastung, da die Fasern parallel ausgerichtet werden ohne strukturell Schaden zu nehmen, so dass deren Elastizität erhalten bleibt. Mit der Erfassung der Steifigkeit können parallel dazu Zyklische Elongation und Dehnungsunterschiede der getesteten Transplantate bestimmt werden, deren Erfassung eine Einschätzung über Elastizität und Rigidität ermöglichen. Erst wenn die Zugkraft submaximale Werte (>1500 N) erreicht, kommt es zu nichtreversiblen strukturellen Veränderungen im Sinne von Faserrissen und letztendlich zur Ruptur des VKB (Luciani, 2003). Sind diese submaximalen Kraftwirkungen erreicht, dehnt sich das VKB ohne weitere Krafterhöhung irreversibel aus (Elongation/Creep) und die Kraft – Dehnungs – Kurve verläuft jetzt im Kraft– Dehnungs – Diagramm nahezu waagerecht. Die maximale

Versagenslast dokumentiert die Krafteinwirkung, die zu einem Integritätsverlust des vorderen Kreuzbandes oder seiner Ersatzplastik führt (Abb.5). Da diese kritische Krafteinwirkung postoperativ nicht bei Rehabilitationsmaßnahmen, sondern nur akzidentell auftritt, erfolgt die Überprüfung der Biomechanik im aussagekräftigeren submaximalen Bereich.

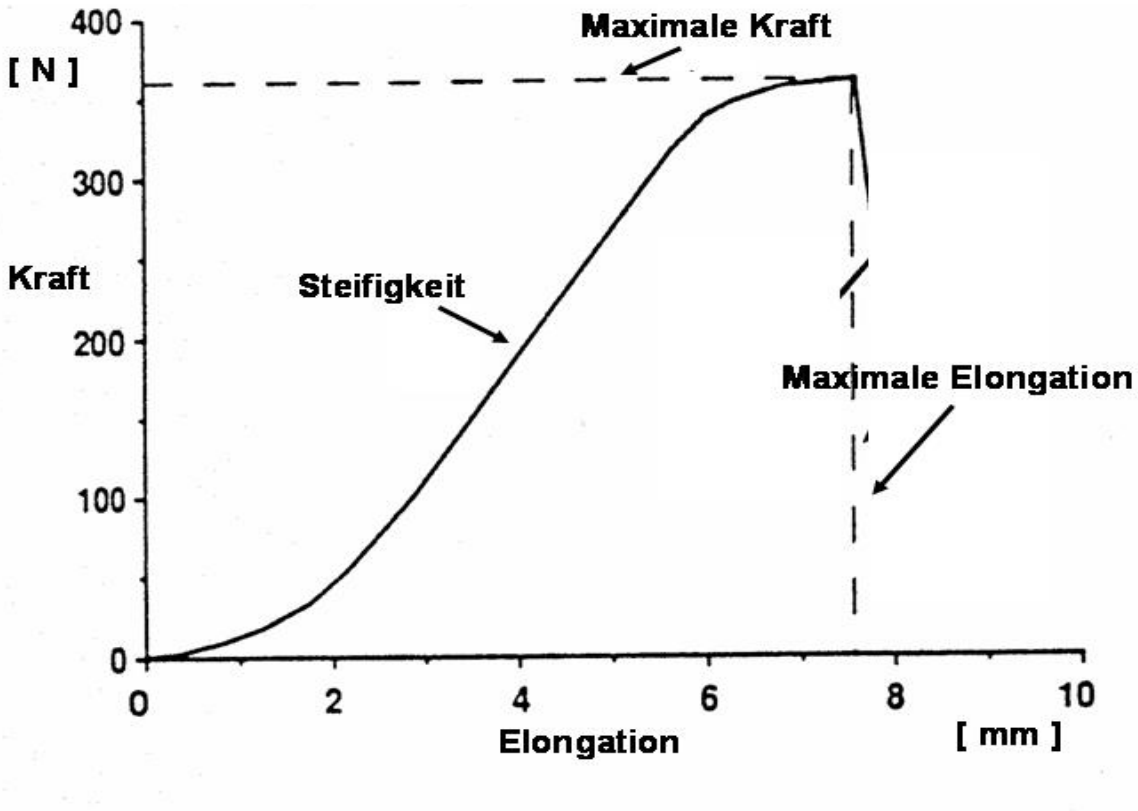


Abbildung 5: Kraft-Strecke-Hysteresekurve beim Versagenstest (Gonnermann, 2009)

Das native VKB besitzt eine maximale Versagenskraft von ca. 2000 N, bei einer Steifigkeit von 242 ± 28 N/mm (Woo et al., 1997; Scheffler, 2002). Ähnliche biomechanische Eigenschaften besitzen eine 10mm breite Patellarsehne (max. Versagenskraft 1784 ± 580 N; Steifigkeit 210 N/mm) und eine 4-fache Hamstringsehne (max. Versagenskraft 2422 ± 538 N; Steifigkeit 238 N/mm) (Wilson et al., 1999). Belastungen des humanen VKB sind nach biomechanischen Messungen unter physiologische Bedingungen abhängig von der Kniegelenksstellung und von der Art der Belastung. Die Zuglast beim Fahrradfahren beträgt ca. 26 N, beim Gehen 178 N und beim Joggen 556 N (Noyes et al., 1984). Bei Flexion des Kniegelenks bis 15^{o} kommt es zu einer Dehnung des VKB von 1,1 mm und bei Flexion bis 45^{o} von 2,6 mm (Beynnon et al., 1992). Im Hinblick auf die Auswahl von Transplantaten,

deren Konservierung und für die Wertung von Sterilisationsverfahren besitzen Messungen der biomechanischen Eigenschaften somit einen eminenten Stellenwert.

1.4 Anforderungen an die Herstellung von VKB-Allografts

Einleitend sei auf einige juristische Aspekte hingewiesen, die im Rahmen der Herstellung von allogenen Gewebetransplantaten in Deutschland zu beachten sind. Für die postmortale Entnahme von Geweben bedarf es der schriftlichen Einwilligung des mündigen und volljährigen Spenders zu Lebzeiten oder des bzw. der juristisch nächsten Angehörigen nach dem Tode. Die Entnahme selbst folgt den Vorgaben des TPG und der TPG-GewV und muss unter Leitung eines qualifizierten Arztes gemäß § 8d TPG stattfinden. Es bedarf des Weiteren einer Gewebebank, der durch die zuständige Landesbehörde die Erlaubnis zur Entnahme und Testung von Spendergewebe (§ 20b AMG) sowie zur Herstellung von Allografts (§20c AMG oder § 13 AMG) erteilt wurde. Ein Qualitätssicherungssystem gemäß § 3 (3) AMWHV muss vorgehalten werden (u.a. qualifiziertes Personal, angemessene bauliche Voraussetzungen, Einhaltung der guten fachlichen Praxis nach dem neuesten Stand der Wissenschaft). Des Weiteren muss die Gewebeeinrichtung über Zulassungen gemäß § 21 AMG oder Genehmigungen gemäß § 21a AMG verfügen. Die Voraussetzungen zur gesetzeskonformen Herstellung von Allografts sind somit sehr anspruchsvoll und nur von wenigen Einrichtungen in Deutschland realisierbar.

1.4.1 Infektionsrisiko allogener muskuloskelettaler Gewebetransplantate

Eine der wesentlichsten Anforderungen an die Bereitstellung von Allografts für den klinischen Einsatz ist die weitestgehende Reduktion des Infektionsrisikos. Aufgrund dessen, dass das Ausgangsgewebe für die Herstellung der Allografts in der Regel von Verstorbenen stammt, ist die Übertragung von Viren, Bakterien und Pilzen grundsätzlich nicht auszuschließen und gegenüber Lebendspendern (z.B. Femurköpfe) mit einem höheren Risiko verbunden (Anamneseerhebung, postmortale Keimbesiedlungen etc.).

1.4.1.1 Virusübertragungen

Bisher wurden nur sehr wenige Übertragungen durch klinisch relevante Viren beschrieben. Eine Zusammenstellung der bisher beschriebenen Übertragungen für muskulo-skelettales Gewebe zeigt Tabelle 1. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die berichteten Virusübertragungen bis auf eine Ausnahme (gewaschene Bone-Tendon-Bone-Transplantate)

durch nicht prozessierte bzw. nicht inaktivierte Gewebe erfolgten. Bei Empfängern von Geweben desselben infektiösen Spenders, die prozessiert (mechanische Präparationen, Spülungen zur Reinigung und Entfernung der Restblutmenge) und abschließend lyophilisiert worden sind, wurden keine Infektionen festgestellt. Für die Infektionsübertragung durch unprozessierte bzw. nicht-inaktivierte Gewebe spricht auch ein Bericht von *Marthy und Richter*, die HIV in gefrorenen Rippentransplantaten, die bei einem HIV-infizierten Patienten zu Studienzwecken 44 Stunden postmortal entnommen wurden, nachweisen konnten (Marrthy und Richter, 1998). Auch humanes HIV-2 blieb trotz Einfrier-/Auftauprozeduren in allogenem Knochengewebe nachweisbar (Cook et al., 1995).

Tabelle 1: HIV-, HCV-, HBV-Übertragungen durch muskuloskelettales Gewebe und Haut (Pruss,2008)

Virus	**Jahr**	**Gewebe, das zur Übertragung führte**	**Autor**
HIV	1984	4 Knochentransplantate gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, keine HIV-Testung; Anm.: 8 Transplantate desselben Spenders ohne Infektion der Empfänger	(Schratt et al., 1996)
HIV	1984	1 Knochentranspl. gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, keine HIV-Testung	(CDC, 1988)
HIV	1985	3 Knochentransplantate gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, Anm.: 25 Transplantate desselben Spenders (Sehen, Bänder, Knochen) nach Ethanol und /oder Lyophilisation ohne Infektion der Empfänger	(Simonds et al., 1992)
HIV	1987	1 Hauttransplantat gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, transplantiert bevor (positives) HIV-Test-Ergebnis vorlag	(Clarke,1987)
HIV	1996	1 Femurkopftranspl. gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, keine HIV-Testung	(Li et al., 2001)
HCV	1985	1 Knochentransplantat gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, keine HCV-Testung	(Conrad et al., 1992)
HCV	1985	1 Femurkopf-Transplantat gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, keine HCV-Testung	(Eggen und Nordbo, 1992)
HCV	1986-1990	2 Knochentransplantate gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, keine HCV-Testung; Anm.: retrospektive Untersuchung, beide Empfänger polytransfundiert, drei Knochentransplantate desselben Spenders führten nicht zur Infektion.	(Pereira et al., 1993)
HCV	2000	3 Bone-Tendon-Bone-Transplantate gefrierkonserviert, gewaschen, anti-HCV-negativ, keine HCV-NAT, 1 Tibialis anterior-Sehne kryokonserviert, anti-HCV negativ, keine HCV-NAT, Anm.: 16 Knochentransplantate desselben Spenders nach Prozessierung und Bestrahlung (16,4-19,7 kGy) ohne Infektion der Empfänger	(Tugwell et al., 2005)
HBV	1954	1 Knochentranspl. gefrierkonserviert, nicht sterilisiert, keine HBV-Testung	(Shutkin,1954)

1.4.1.2 Übertragungen von Bakterien

Die Übertragung von nichtviralen Erregern durch allogene muskulo-skelettale Gewebe ist ebenfalls beschrieben worden. Untersuchungen der CDC in US-amerikanischen Gewebebanken zeigten, dass im Zeitraum 2000-2002 (ca. 2 Millionen muskulo-skelettale Transplantationen) insgesamt 26 Patienten transplantatbedingte Infektionen erlitten (MMWR-CDC, 2002). 13 von 26 Patienten wurden durch allogene Sehnen (8), Femurkondylen (2), Spongiosa (2) und Menisci (1) mit Clostridium septicum bzw. Clostridium sordelli, infiziert. Alle Gewebe waren zwar aseptisch entnommen, jedoch keinem terminalen Desinfektions- bzw. Sterilisationsverfahren unterzogen worden. Weitere 11/26 Patienten waren mit gramnegativen Bakterien infiziert worden, in zwei Fällen konnte der Erreger nicht eindeutig ermittelt werden. Die übertragenen Transplantate waren zumeist frisch oder gefrierkonserviert, in einem Fall auch gefriergetrocknet (CDC, 2002). Folglich sind bei muskulo-skelettalen Geweben die Übertragungen von Bakterien ebenfalls eine nicht zu unterschätzende Gefahr (Borden et al., 2001, Vangsness et al., 2003). Fälle der Übertragung von pathogenen Bakterien gab es in der Vergangenheit zwar selten, vereinzelte Fälle wurden aber dokumentiert. So berichteten *Kainer* et al. (2004) über Infektionen nach Transplantation allogener muskulo-skelettaler Grafts durch Clostridien und andere, sporenbildende Bakterien (grampositive Stäbchen/B. anthracis) Insofern ist es trotz des quantitativ geringen Risikos einer Infektionsübetragung notwendig, geeignete Inaktivierungsverfahren bei der Herstellung muskulo-skelettaler Gewebe zu etablieren.

1.4.2 Sterilisationsverfahren für muskuloskelettale Allografts

Unter Beachtung aller gegenwärtig zur Verfügung stehenden präventiven Verfahren, besteht ohne zusätzliche Sterilisation der Allografts ein geringes Infektionsrisiko für den Rezipienten (Buck et al., 1989). In den USA wird dieses Restrisiko als so gering ein-geschätzt, dass die national zuständige Behörde (FDA) für muskuloskelettale Allografts keine zusätzlichen viruziden Sterilisationsverfahren fordert, diese aber grundsätzlich empfiehlt. In Deutschland sollte das Spendergewebe, sowie biologisch vertretbar, einem geeigneten Sterilisationsverfahren unterzogen werden, da es als Arzneimittel eingestuft ist und im Regelfall elektiv eingesetzt wird (Hübner et al., 2009). Gegenwärtig stehen in Deutschland mehrere Sterilisationsverfahren zur Verfügung, die den rechtlichen Auflagen aus Sicht der Inaktivierungskapazität Rechnung tragen

1.4.2.1 Peressigsäure-Ethanol (PES)

Das kostengünstige PES–Unterdruckverfahren (PES-Sterilisation) hat sich zu einem etablierten Sterilisationsverfahren für allogene Knochentransplantate mit einem sicheren antibakteriellen, antimykotischen und antiviralen Schutz entwickelt (Sprössig und Mücke, 1969; Starke et al., 1984; v. Versen und Starke, 1989; Roberts et al., 1991). Überzeugende in vitro Ergebnisse über die viruzide und antibakterielle Wirkung dieses chemisch wirksamen Verfahrens liegen nach Anwendung bei allogenen Knochenpräparate unter Konservierungs- und Gewebebankbedingungen vor (Pruss et al., 2001b; 2003). In jüngster Zeit wurde diese Technik auch für den allogenen Herzklappenersatz erfolgreich eingesetzt (Farrington et al., 2002).Der antimikrobielle Schutz hat sich auch nach Anwendung bei Haut- und Knorpelpräparaten bestätigt (Scheffler et al., 2005/2007). Dem Sterilisationsprozess mit PES geht eine Reduktion der Immunogenität durch Entfernung von hoch immunogenem Gewebe und Blut voraus. Hierbei wird das zu sterilisierende Gewebe primär unter hohem Druck von Fett und Blut mit sterilem Wasser gereinigt sowie in einer Lösung aus Chloroform und Methanol abschließend entfettet. Nach Entfernung des Chloroforms wird die eigentliche Sterilisation unter niedrigem Druck (200 mbar) durchgeführt. Die entfetteten Transplantate werden hierfür mit Peressigsäurelösung bedeckt, die den Zelltod möglicher Erreger bewirkt (Gonnermann, 2009). Die bakterizide, fungizide, sporizide und Viren abtötende Wirkung beruht darauf, dass lipidlösliche PES- Moleküle die Zellmembran von Mikroorganismen passieren können und intrazellulär von Enzymen Sauerstoff abspalten. Bevorzugt werden zelluläre Strukturen mit S-H – und S-S – Gruppen. PES erreicht eine effiziente Abreicherung für klinisch relevante Viren von > $4\log_{10}$ ($TCID_{50}$ /ml) und für Bakterien, Sporen und Pilze von > 5 $\log_{10}$ (cfu/ml) (Pruss et al., 2003). Untersuchungen über die Beeinflussung von PES auf Histologie, Struktur, Biomechanik und Remodeling von BPTB – Präparaten haben differenzierte Ergebnisse gezeigt. Die PES–Sterilisation führt nicht zu zytotoxischen und inflammatorischen Veränderungen an BPTB–Grafts (Lomas et al., 2004). Erste in vitro Untersuchungen zum Einfluss der PES auf biomechanischen Eigenschaften an BPTB–Präparaten haben nachgewiesen, dass die initiale Biomechanik von BPTB–Grafts nicht negativ beeinflusst wird (Scheffler et al., 2005; 2007). Entgegen der Resultate von in vitro Studien zeigten die Untersuchungen von Gonnermann et al an einem in vivo Modell beim Schaf, dass die PES–Sterilisation in der Frühphase nach der Implantation zu einer Verzögerung des Remodelings und zu einer deutlichen Beeinträchtigung der

biomechanischen Eigenschaften der allogenen Sehnen führt, so dass dieses Verfahren für die Sterilisation allogener VKB–Spendersehnen gegenwärtig kritisch betrachtet wird (Gonnermann, 2009).

1.4.2.2 Thermodesinfektion

Dieses Verfahren ist derzeit nur für die Behandlung allogener Femurkopftransplantate validiert (Pruss et al., 2003) und besitzt in Deutschland eine Genehmigung nach § 21a AMG. Da dieses Verfahren auf einem Thermoinaktivierungsschritt (> 82,5°C für mindestens 15 Minuten) beruht, ist es für die Behandlung von kollagenem Weichgewebe nicht anwendbar.

1.4.2.3 Tutoplast®-Sterilistion

Dieses von der Firma Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand, Deutschland) entwickelte Verfahren beinhaltet eine Kombination einer chemischen Behandlung von Spendersehnen mit einer Gammabestrahlung (15 kGy). Es wurde initial für die Sterilisation von Knochen entwickelt, fand schließlich aber auch Einsatz in der Behandlung von Sehnentransplantaten. Dabei wurde eine gravierend erhöhte Versagerrate der VKB Rekonstruktionen, vor allem in Patientengruppen mit hohem Aktivitätsniveau, festgestellt (Gorschewsky, 2002, 2005). Daher findet dieses Verfahren zur Sterilisation von Transplanten für die Kreuzbandchirurgie kaum mehr Verwendung.

1.4.2.4 Bestrahlung

Weltweit am häufigsten angewendet und verbreitet für die Sterilisation von allogenem Gewebe ist die Bestrahlung. Der Mechanismus der Erregerabtötung besteht darin, dass bestrahltes Gewebe die Energie des Elektronenstrahls absorbiert und diese Energieaufnahme die DNA-/RNA-Ketten von Mikroorganismen direkt, bzw. indirekt durch die Bildung von Hydroxylradikalen (*OH), insbesondere in Gegenwart von H_2O, zerstört. Es gibt zwei wesentliche Formen der Bestrahlung von Geweben: Die Gamma und die E-Beam Bestrahlung. Vor mehr als 50 Jahren wurde erstmals über eine Gammabestrahlung allogener Knochentransplantate berichtet (Turner et al., 1956; DeVries et al., 1958; Basset und Packard, 1959). Bezüglich der Bestrahlungsdosen unterscheidet man zwischen Niedrig- (15 kGy) und Hochdosierung (> 25 kGy). Während Niedrigdosen einen sichere Abtötung bakterieller Erreger garantieren (Halls, 1992; Dziedzic-Goclawska et al., 1997/2005), lassen sich Viren, insbesondere HIV-1, HIV-2, Hepatitis – B und C nur nach einer Hochdosis – Bestrahlung von

mehr als 25 kGy inaktivieren (Pruss et al., 2002a). Die Sicherheit, mit der jede Form von ionisierender Strahlung alle im Gewebe vorhandenen Mikroorganismen abtötet, ist abhängig von der Strahlungsenergie, dem Grad der initialen Keimbesiedlung („bioburden"), der Widerstandsfähigkeit der Keime und der Temperatur der Präparate. Die Sicherheit der Keimreduktion in allogenen Gewebepräparaten wird mit dem sterility assurance level (SAL) oder mit dem Dezimalen Reduktionswert (D_{10}) angegeben (Russell, 1999).

Der SAL benennt, die nach der Sterilisation wahrscheinliche Zahl noch vorhandener pathogener Keime und definiert somit die Menge an Pathogenen, die nach einer Sterilisation noch im Gewebe zu erwarten sein dürfen. Dabei wird immer von einem worse case bioburden ausgegangen. SAL 10^{-6} beinhaltet die Aussage, dass nach der Sterilisation weniger als 1 pathogener Keim im bestrahlten Gewebe vorhanden ist. In den USA werden 25 kGy empfohlen (IAEA, 2004). Der Sicherheitsgrad, mit der eine bestimmte Keimreduktion erfolgt, wird mit dem Dezimalen Reduktionswert (D_{10}) angegeben. Bei Anwendung von Strahlensterilisation wird der D_{10}–Wert in kGy angegeben und impliziert die Strahlendosis, die erforderlich ist, um die initiale Mikropopulation um 90% (1 log-$_{10}$TCID50/ml) zu reduzieren. Einen wesentlichen Einfluss auf den D_{10}–Wert hat die Temperatur der Gewebepräparate während der Sterilisation. Bei Raumtemperatur wird der D_{10} – Wert für HIV-Viren mit 7,2 kGy γ – Strahlung erreicht, während bei -80 ^{o}C 8,3 kGy erforderlich sind (Hernigou et al., 2000). Um eine Reduktion der initialen viralen Mikropopulation von 4 log-$_{10}$ zu erreichen (Empfehlung in Deutschland), müsste die Strahlendosis somit bei Raumtemperatur 28,8 und bei -80 ^{o}C 33,2 kGy betragen. *Hiemstra et al.* konnten zeigen, dass eine Reduktion des Virustiters (HIV) um 5–6 log$_{-10}$ bei Bestrahlungsdosen von 50 – 100 kGy in frisch gefrorenen Präparaten (-80 ^{o}C) erreicht wird (Hiemstra et al., 1991). *Pruss et al* (2002a) wiesen in einer umfangreichen Studie an 3 behüllten und 3 unbehüllten Viren nach, dass eine Virusreduktion um 4 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ eine Bestrahlungsdosis von 34 kGy erfordern. In Tabelle 2 sind die ermittelten D_{10}-Werte von *Pruss et al* (2002a), *Garcia et al* (1987) *Hiemstra et al* (1991) und *Hernigou et al* (2000) für verschiedene Erregerarten erfasst:

Tabelle 2: D_{10}-Werte (kGy) für eminent-pathogene Viren, Bakterien und Pilze

Mikroorganismus	D_{10}-Werte
Bovines Parvovirus	7,30
HIV-1	7,20
Hepatitis A Virus	5,30
Herpesvirus-3	5,30
Bovines Virus Diarrhoe-Virus	< 3,00
Streptococcus faecium	2,80
Clostridium sporogenes	1,60
Candida crusei	1,16
Salmonella spp	1,10
Bacillus subtilis	0,60
Escherichia coli	0,31
Enterobacter spp	0,31
Campylobacter jejuni	0,23
Staphylococcus aureus	0,20
Pseudomonas aeruginosa	0,16
Aspergillus niger	0,04

1.4.2.4.1 Gammastrahlen-Sterilisation

Gammastrahlung ist eine besonders durchdringende, elektromagnetische Strahlung die beim Zerfall der Atomkerne vieler natürlich vorkommender oder künstlich erzeugter radioaktiver Nuklide entsteht (Abb.6).

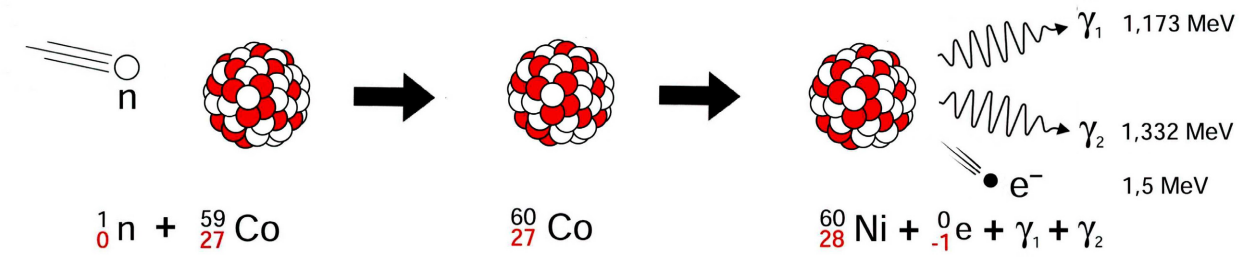


Abbildung 6: Prinzip der Freisetzung von Gammastrahlen (Gamma Service Radeberg)

Aus einer Qualitätssicherungsanalyse der Gewebebank in Warschau, Polen, an 250.000, zwischen 1963 und 2005 mit 35 kGy gammasterilisierten allogenen und xenogenen Gewebepräparaten geht hervor, dass es in dieser Zeit keine Empfängerinfektion gegeben hat (Dziedzic-Goclawska, 2005). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass eines der resistentesten Virus, das Bovine Parvovirus, bei tiefgefrorenen Knochentransplantaten eine γ – Strahlendosis von 34 kGy zur Reduktion um 4 log10-Stufen (TCID50/ml) erforderte (Pruss et al., 2002a). Für den Einsatz der Gammasterilisation bei allogenen Knochen – Sehnen– Transplantaten ist die mögliche Schädigung der kollagenen Grundstruktur dieser Gewebe von eminenter Bedeutung. Dabei spielt die Vorbehandlung und Konservierung der Sehnenpräparate eine wichtige Rolle.

In einer Studie mit Gammabestrahlung von Achillessehnen vom Kalb wurde das Dosis-abhängige Auftreten von Kollagenfragmenten an frischen und lyophilisierten Sehnenpräparaten untersucht. Während unbestrahlte Kontrollen und frische, mit 25 kGy bestrahlte Sehnen 1,07 % bzw. 0,75 % Kollagenfragmente aufwiesen, hatten die lyophilisierten Sehnen bei dieser Dosis einen Anteil von 3,98 %. Dieser Anteil betrug bei Bestrahlung mit 35 kGy in frischen Sehnen 1,72 % und nach Lyophilisierung 5,46 % (Dziedzic–Goclawska, 2000). Insofern ist davon auszugehen, dass die Bestrahlung von lyophilisiertem Gewebe zu höheren Strahlenschäden führt. Die gegenwärtige rechtliche Situation in Deutschland verlangt für die Anwendung der Gamma Bestrahlung vor dem klinischen Einsatz eine sichere Infektionsprophylaxe für den Empfänger allogener Gewebspräparate. Für die Gammasterilisation bedeutet das unter der Zielstellung der Virussicherheit eine Dosis von ≥ 30 kGy.

Da bei einer Bestrahlung von allogenem Sehnengewebe mit 30 kGy in vitro eine deutliche Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften von allogenen Sehnengrafts festgestellt wurde (Rasmussen et al.,1994; Fideler et al., 1994) und nach klinischem Einsatz derart vorbehandelter Transplantate eine inakzeptable Versagerquote auftrat (Rappe et al., 2007; Sun et al., 2009), ist dieses Sterilisationsverfahren in der geforderten Dosierung für den klinischen Einsatz obsolet.

1.4.2.4.2 Elektronenstrahlen-Sterilisation

Im Gegensatz zur Gammastrahlung (elektromagnetische Wellen) ist die Elektronen-Strahlung (E-Beam) eine Partikelstrahlung. Zur Erzeugung von Elektronenstrahlen in Linearbeschleunigern wird keine radioaktive Quelle benutzt, sondern durch Erhitzung einer Glühkathode werden freie Elektronen erzeugt (Elektronenkanone). Diese Elektronen werden durch eine angelegte hohe Spannung beschleunigt, wobei der Elektronenstrahl pulsförmig oder kontinuierlich abgegeben wird. Die Elektronen werden zu einem Strahl fokussiert und auf das zu sterilisierende Präparat gelenkt. Um einen Schutz vor induzierter Radioaktivität sicherzustellen, wird die angewendete Energie auf maximal 10 MeV beschränkt. Ein Nachteil der Elektronenstrahlung ist eine, im Vergleich zur von Radionukliden erzeugten Gammastrahlen, geringere Tiefenwirkung. Diese ist abhängig von der applizierten Energie sowie der Struktur und Dichte des zu bestrahlenden Produktes. Bei einer Dichte entsprechend der von Wasser ($1 g/cm^3$) sollte die maximale Dicke des Produktes bei einer Bestrahlung von 2 Seiten 8 cm nicht überschreiten (Dziedzic-Goclawska, 2005). Demnach beträgt die Eindringtiefe von Elektronen eines Beschleunigers mit einer Energie von 20 MeV in Wasser etwa 10 cm. Danach sind praktisch alle Elektronen absorbiert. Elektronen geringerer Energie, also z.B. von 1 MeV, würden durch 0,5 cm Wasser absorbiert sein. In anderem Material als Wasser bzw. Gewebe gilt diese "Energiehalbierungsregel" nicht. In Blei beispielsweise beträgt die Reichweite von Elektronen mit einer Energie von 20 MeV rund 10 mm (http://www.onmeda.de/lexika/strahlenmedizin/compton_effekt-reichweite-von elektronen-4762-8.html). Die Elektronstrahlsterilisation erfordert die gleichzeitige Steuerung von Stromstärke, Abtastbreite, Energie des Strahls und die Geschwindigkeit, mit der das Material unter dem Strahl transportiert wird. Letzteres kontrolliert ein im Gerätesystem vorhandener Feedback-Mechanismus. Vorteile gegenüber der Gammasterilisation sind eine geringere Expositionszeit von Minuten für E-Beam gegenüber Stunden für Gamma und die bei Gammastrahlen vorkommende Dosisabweichung ist minimiert. In einer Vergleichsstudie mit 50 kGy Gamma- und E-Beam-Bestrahlung der Achillessehne von Kaninchen unter Protektion mit Radikalfängern (Mannitol, Ascorbinsäure, Riboflavin) zeigte die Versuchsgruppe mit E-Beam-Bestrahlung und Riboflavinprotektion gegenüber der Gammabestrahlung eine geringere Beeinträchtigung der Biomechanik (Seto et al., 2008). Daraus resultierte die wissenschaftliche Fragestellung, ob nach E-Beam-Sterilisation hinsichtlich der Biomechanik

von allogenen BPTB-Transplantate bessere Resultate resultieren, als nach Gammabestrahlung.

1.5 Ziel der Untersuchungen

Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass es bei Sterilisation mit Gamma Bestrahlung in Dosierungen von 10 bis 50 kGy eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit hinsichtlich der negativen Beeinflussung biomechanischer Eigenschaften von allogenen Sehnentransplantaten gibt (Gibbons et al., 1991; Anderson et al., 1992; Rasmussen et al., 1994; Salehpour et al., 1995; Fideler et al., 1995; Currey et al.,1997; Yusof, 2000). Da keine vergleichbaren Untersuchungsergebnisse über die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit der E-Beam-Sterilisation an BPTB–Transplantate in der Literatur beschrieben sind, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, folgende experimentelle Untersuchung durchzuführen:

- Analyse der Auswirkung von E-Beam-Sterilisation unter Gewebeprotektion auf die biomechanischen Eigenschaften von humanen BPTB–Transplantaten mit unterschiedlichen Dosierungen zwischen 15 und 34 kGy.
- Vergleich der Wirkung von E-Beam– und Gammasterilisation auf die biomechanischen Eigenschaften dieser Allografts.
- Optimierung der E-Beam-Sterilisation durch fraktionierte Dosierung mit dem Ziel, die biomechanische Beeinträchtigung auch bei einer Dosierung von 34 kGy zu minimieren.
- In-vivo-Überprüfung der Auswirkung der High Dose E-Beam-Sterilisation auf das frühe „Ligamentisierungs--Remodeling“ -Verhalten allogener Sehnentransplantate im Tierversuch.

1.6 Problemstellung und Hypothesen

In Deutschland unterliegen allogene Sehnen-Knochen-Transplantate dem Arzneimittelgesetz und der Gesetzgeber fordert eine sichere Abtötung von Viren, Bakterien, Pilzen und Sporen. Bakterielle Krankheitserreger und Pilze können mit einer Gammabestrahlung in einer Dosierung von 15 kGy sicher abgetötet werden (Dziedzic-Goclawska et al., 2005). Diese Niedrigdosis beeinflusst die biomechanischen Eigenschaften von BPTB–Grafts kaum (Fideler et al., 1995). Dagegen werden Viren in dieser Dosierung nicht sicher eliminiert. Die Hochdosis-Gammabestrahlung in einer Dosierung von $\geq$ 30 kGy würde, unter

Berücksichtigung des jeweiligen bioburdens, zu einer effizienten Abreicherung von Mikroorganismen inklusive Viren führen. Jedoch erzeugt diese Dosis auch erhebliche Schäden an den Geweben, die in einer Reduktion der biomechanischen Eigenschaften resultiert. Möglichkeiten zur Verminderung dieser schädigenden Wirkung der Bestrahlung auf das Gewebe bestehen in der Zugabe von Radikalfängern. *Grieb et al* zeigten, dass die schädigende Wirkung von Gamma Bestrahlung auf Bone-Grafts durch die Zugabe von antioxidativem Ascorbat und Gefriertrocknung deutlich reduziert werden konnte (Grieb et al. 2005). In einer Folgearbeit wiesen die Autoren nach, dass trotz Zugabe potenter Radikalfänger (Propylenglykol und DMSO) mit Schonung der Gewebeeigenschaften eine hinreichende Abreicherung von Viren und Bakterien an BPTB-Grafts erzielt werden konnte. Die Ergebnisse wurden patentiert und sind heutzutage als sog. CLEARANT-Verfahren (Grieb et al., 2006) kommerziell verfügbar. Schließlich zeigte eine weitere Studie, dass auch bei Zugabe von CO_2 zum Sauerstoffausschluss eine signifikante Reduktion der Radikale eintritt (Klose et al., 2006). Insofern ist zu prüfen, ob die Anwendung von E-Beam bei -80 °C und Inokulation von CO_2 als Radikalfänger eine geeignete Bestrahlungsform zur Sterilisation von Sehnentransplantaten darstellen könnte.

Dabei existieren bisher nur wenige in vitro Untersuchungen und keine in vivo Studien, die den Einfluss des E-Beam Sterilisationsverfahrens auf die biomechanischen Eigenschaften freier allogener Sehnentransplantate als VKB-Ersatz untersucht haben. Mit der E-Beam Sterilisation, deren antimikrobieller Mechanismus der Gammabestrahlung gleicht, könnte eine alternative Technologie für die sichere Sterilisation allogener Gewebetransplantate geschaffen werden. Für humane allogene BPTB–Transplantate liegen bisher keine Untersuchungsergebnisse vor. Für die hier vorliegenden Untersuchungen und Ergebnisse wurden folgende Hypothesen postuliert:

- Die biomechanischen Eigenschaften von Sehnengewebe werden in-vitro durch die E-Beam-Sterilisation mit Strahlendosen von 15, 25, 34 kGy gegenüber nicht bestrahltem Gewebe dosisabhängig beeinflusst.
- Die beeinträchtigende Wirkung auf die biologischen Eigenschaften ist bei Einsatz von E-Beam geringer als bei Gammabestrahlung.

- Bei Verwendung eines Radikalfängers (CO_2) und unter Transplantatkon-servierung von -80^{o} C während der Bestrahlung, ist die Beeinträchtigung der Biomechanik vermindert.
- Bei fraktionierter E-Beam-Sterilisation in einer Dosierung von 34 kGy ist die biomechanische Beeinträchtigung im Vergleich zur herkömmlichen E-Beam- und Gammabestrahlung in derselben Dosierung signifikant geringer.

2. Material und Methoden

2.1 Sehnentransplantate

In dieser Studie wurden zur biomechanischen Testung 146 frische humane Patellarsehnen nativ, bzw. nach Behandlung mit energiereichen Elektronen- und Co-60 Gammastrahlung verwendet (Abb.9). Das Material wurde von verstorbenen Spendern entsprechend der Vorgaben des Transplantationsgesetzes, der Vorschriften des Deutschen Instituts für Zell- und Gewebeersatz, Berlin (DIZG) und der Gewebebank der Charité - Universitätsmedizin in Berlin innerhalb von 36h postmortem entnommen, bei - 20 °C in luftdicht verschlossenen Plastikbeuteln tiefgefroren und vor Präparation bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Durchschnittsalter der Gewebespender (n=39) lag bei 56,9 Jahren, davon waren 21 männlich und 18 weiblich.

Zur Präparation der Sehnen wurden nach dem Auftauen der Kniegelenke die Muskeln und restliches Weichteilgewebe entfernt und nach Freilegung die Sehnen gewonnen. Während des Auftauens und der Präparation wurden die Sehnen mit in physiologischer Kochsalzlösung befeuchteten Kompressen umwickelt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Das BPTB-Transplantat enthielt als knöchernen Block einen medialen Anteil der Patella und einen Knochenblock aus dem Bereich der Tuberositas tibiae. Soweit es nach den anatomischen Vorgaben der BPTB-Transplantate möglich war, wurde jedes Band vertikal in 2 gleich große Transplantate geteilt (Abb. 7).

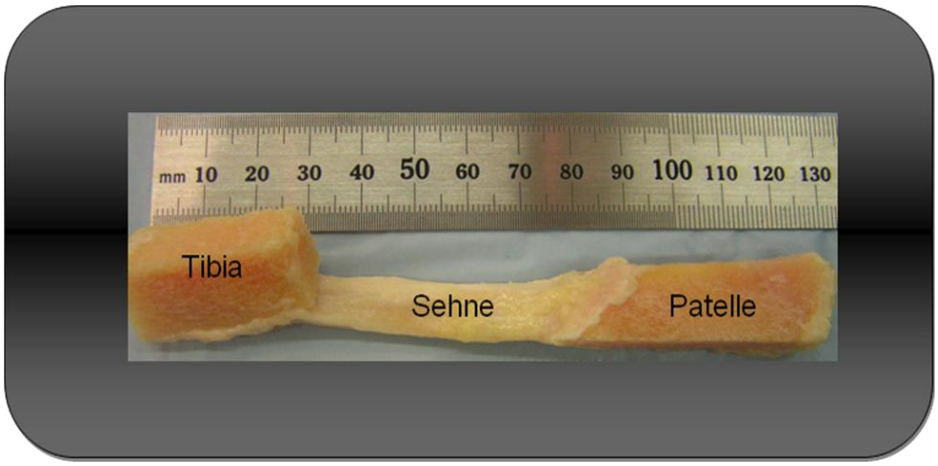


Abbildung 7: Humanes BPTB-Präparat nach Entnahme und Aufbereitung für Sterilisation

Damit war die Entnahme von 4 Transplantaten pro Spender möglich. Die Sehnenbreite der entnommenen humanen BPTB-Transplantate betrug 10 mm und die Länge ca. 45 mm). Um die Knochenblöcke exakt ausschneiden zu können und eine Sehnenbreite von 10 mm zu erhalten wurde eine Knochensäge verwendet (Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland). Die Sehnentransplantate wurden anschließend in geschlossenen Plastiktüten bei - 20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Zur Strahlensterilisation wurde jedes der gefrorenen BPTB-Transplantate im DIZG in einen, aus Polyethylen hergestellten Beutel (17,5 x 13,5 x 2 cm) platziert. In diesen wurde zur Sauerstoffverdrängung CO_2 (Linde Gas Therapeutics GmbH & CO.KG) eingeleitet, wobei über einen Abfluss ein Abzug des vorhandenen Sauerstoffs möglich war. So konnte ein maximaler Sauerstoffrestgehalt von 0,05% im Verpackungsbeutel erreicht werden (Abb. 8). Die Kalibierung der CO_2- Inertisierung erfolgte mit einem Carbo-Zirox-0_2-Monitor (ZIROX-SGM4, Haffmans, Niederlande) mit folgenden Parametern: Spülvolumen 472,5 cm^3, dafür wurden 2 Messungen bei < 0,5 bar, 5 Messungen bei 0,5 bar und 2 Messungen bei 1,0 bar durchgeführt**.** (Abb. 9). Desweiteren erfolgte sowohl der Transport als auch die Bestrahlung auf Trockeneis bei - 70^o C.

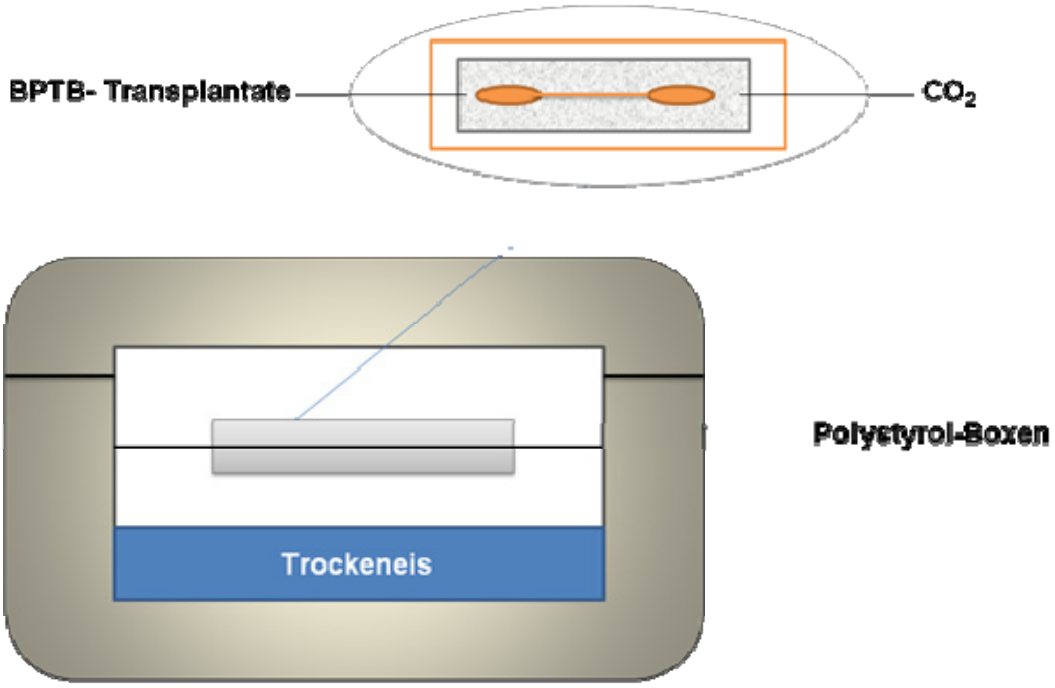


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Verpackung nach Füllung mit CO_2

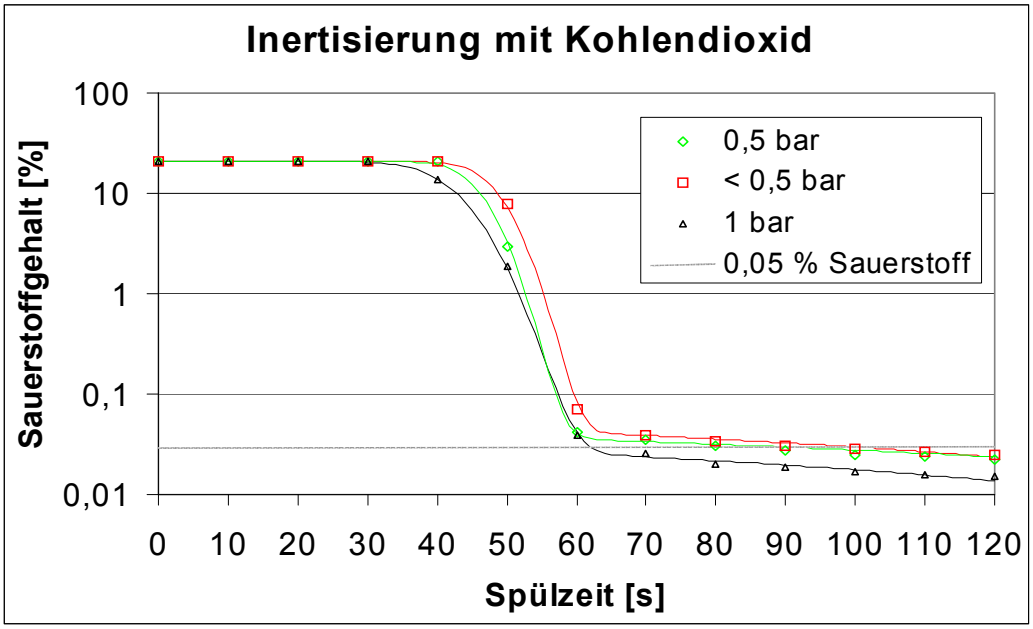


Abbildung 9: Inertisierung mit Kohlendioxid

Die Zuordnung der BPTB-Transplantate zu den jeweiligen Untersuchungsserien (Randomisierung) erfolgte mit der Software „Stata for Windows“ (Stata. Corp. College Station, Texas, USA), nach der die zugewiesenen Blockgrößen dem Zufallsprinzip unterliegen. Um statistisch gesicherte Aussagen zu den postulierten Hypothesen und Zielen vornehmen zu können, wurden folgende 4 in vitro Studien und eine tierexperimentelle Studie durchgeführt.

2.2 Studiengruppen

Die paarigen BPTB-Transplantate wurden auf vier unterschiedliche in vitro Studiengruppe verteilt (Abb. 9). Die Gruppe 1 beschäftigt sich mit der Untersuchung des Einflusses verschiedener Elektronbeam-Strahlendosen auf die biomechanischen Eigenschaften der BPTB-Transplantate und diente der Dosisfindung. Gruppe 2 und Gruppe 3 dienten der Untersuchungen des Einflusses einer mittleren (25 kGy) sowie einer hohen (34 kGy) Gamma- bzw. Elektronenbestrahlung im direkten Vergleich. Gruppe 4 beschäftigt sich mit der Optimierung der Bestrahlungsmethode durch Fraktionierung der Gesamtdosis von (34 kGy). Die Bestrahlung erfolgte in diesem Fall über 10 Einzelbestrahlungsdosen jeweils mit (3,4 kGy). Eine Transplantation von allogenen Flexorsehnen, die mittels einer hohen Dosis Elektronbeam (34 kGy) sterilisiert wurden, erfolgte zur Bewertung der untersuchten

Sterilisationsmethode auf der biomechanischen Eigenschaften der Transplantate während des frühen Remodelings im Tiermodell.

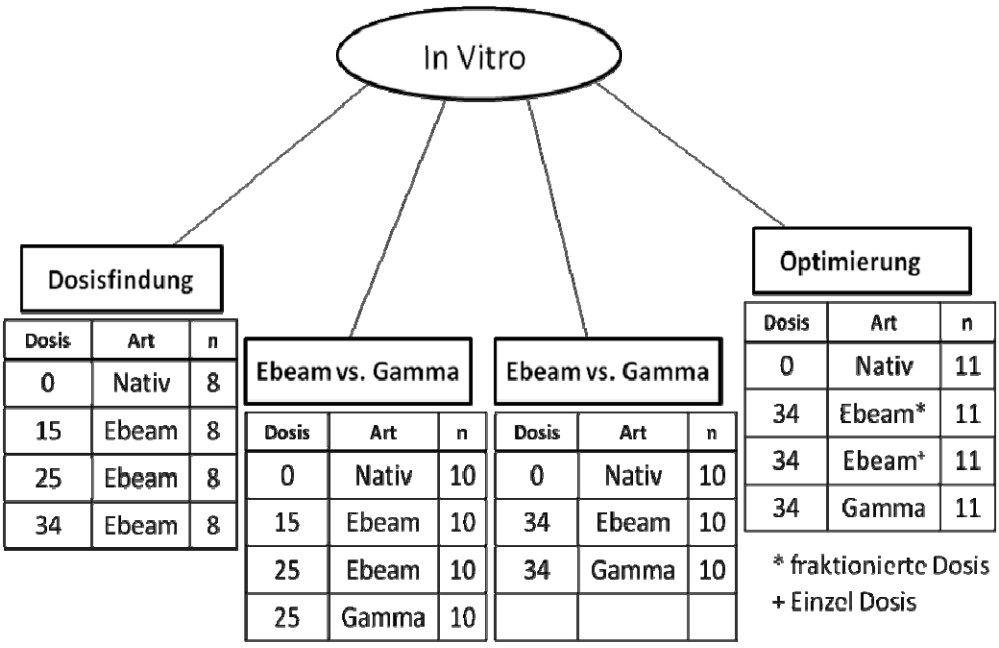


Abbildung 10: In-vitro-Untersuchungsgruppen

2.3 Bestrahlung der BPTB-Transplantate

Die Bestrahlung der konservierten BPTB-Transplantate erfolgte in den Räumlichkeiten der Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH (Radeberg, Deutschland), wobei der Präparate-Transport in mit Trockeneis gefüllten Polystyrol-Boxen bei ca. – 70 °C erfolgte. Der Sterilisationsprozess wurde durchgängig in Bezug auf die absorbierte Dosis kontrolliert. Die Ergebnisse der Alanin-ESR-Dosimetrie wurden in Messprotokollen dokumentiert. Die durchschnittliche Abweichung der festgelegten Dosierung lag bei ± 1,65 KGy. Die Bestrahlung erfolgte jeweils in der gekühlten Transportbox (Abb. 8), separat an zwei Bestrahlungsanlagen. Die Bestrahlung mit Gammastrahlen und mit hochenergetischen Elektronen (E-Beam) unterscheidet sich in folgender Besonderheiten (Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH):

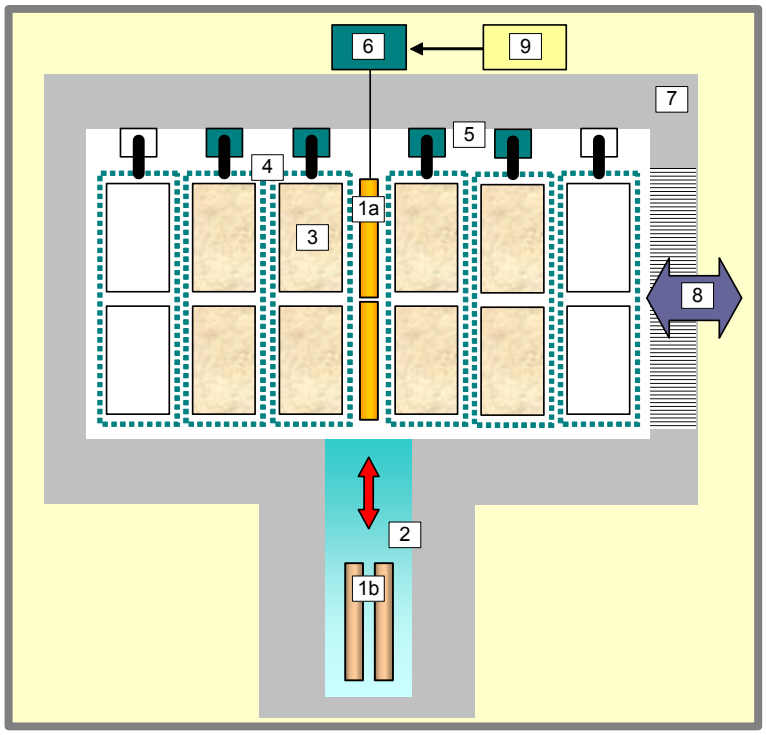
Eigenschaften der Bestrahlungsarten

Gamma-Bestrahlung	**Elektronen-Bestrahlung**
• Parametrische Freigabe ohne Wartezeit	• „On-Way“-Verfahren
• Geringe Energieübertragung	• Hohe Energieübertragung
• Lange Bestrahlungszeiten	• Kurze Bestrahlungszeiten
• Geringe absolute Temperaturerhöhung	• Sprunghafte und große absolute Temperaturerhöhung
• Langsame Reaktionsgeschwindigkeit	• Hohe Reaktionsgeschwindigkeit
• Deutliche Diffusionsprozesse	• Geringe Diffusionsprozesse
• Sauerstoffoxidation	• Geringe Sauerstoffoxidation
• Geruchsbelästigung und Verfärbung	• Verminderte Geruchsbelästigung
• Hohe Materialdurchdringung	• Begrenzte Materialdurchdringung
• Große Produkte	• Meist kleinere Produkte
• Vollständige Palettenware	• Kartonware, Einzelstücke
• Große Materialdicke und hohe Dichte	

2.3.1 Gammabestrahlung

Für die Gammabestrahlung wurde die Anlage GS 3000 benutzt. Die Gammabestrahlung wird technisch dadurch erreicht, dass man das zu behandelnde Material den Gammaquanten aussetzt, die beim radioaktiven Zerfall von Cobalt-60 entstehen. Das zu bestrahlende Material wird dabei mit einem geeigneten Transportsystem durch den Bestrahlungsraum geführt, der aus Strahlenschutzgründen abgeschirmt ist. Das Funktionsprinzip der Anlage ist in Abb. 11 schematisch dargestellt. Um die in den Versuchsansätzen benötigten Strahlungsdosen zwischen 15 bis 34 kGy zu erreichen, waren Bestrahlungszeiten von mehreren Stunden erforderlich.

Aufbau der Bestrahlungsanlage (schematisch)



Seitenansicht

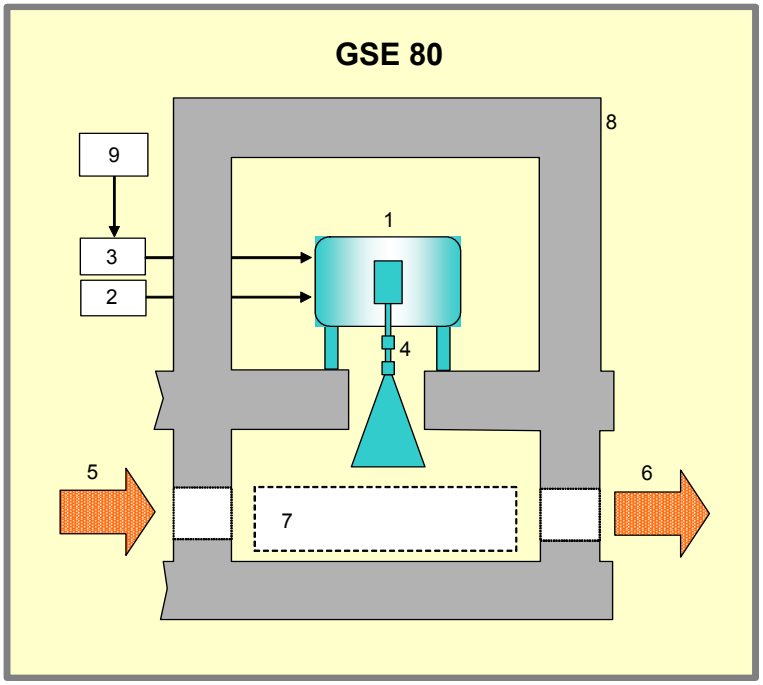
1a Quellenkörbe in Arbeitsposition im Bestrahlungs¬raum
1b Quellenkörbe in Ruheposition im Quellenbecken
2 Quellenbecken (wassergefüllt)
3 Bestrahlungsgut
4 Bestrahlungsbehälter
5 Transportsystem mit Platzwechsel¬einrichtung
6 Hebevorrichtung für Quellen
7 Strahlenschutz-Abschirmung
8 Produktzufuhr- und Produktabfuhrlabyrinth
9 Sicherheitssystem

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Anlage GS 3000
Quelle: Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH

2.3.2 10-MeV-Elektronenbestrahlung (E-Beam)

Für die Bestrahlung mit 10 MeV-Elektronen wurde die Elektronenbestrahlungsanlage GSE 80 verwendet. Die Elektronenbestrahlung wird technisch dadurch erreicht, dass man das zu behandelnde Material den hochenergetischen Elektronen aussetzt, die durch einen entsprechenden Elektronenbeschleuniger (Rodotron TT300) erzeugt werden. Dieses Material wird auch hier wieder mit einem geeigneten Transportsystem durch den Bestrahlungsraum geführt, der aus Strahlenschutzgründen abgeschirmt ist. Das Funktionsprinzip der Anlage ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Um die in den Versuchsansätzen benötigten Strahlungsdosen zwischen 15 bis 34 kGy zu erreichen, sind Bestrahlungszeiten von Minuten erforderlich. Für die Wirksamkeit der Elektronenbestrahlung ist es zwingend erforderlich, dass die vorgegebenen maximalen Schichtdicken des Gewebes eingehalten werden.

Aufbau der Bestrahlungsanlage (schematisch)



Seitenansicht

1 Elektronenbeschleuniger TT 300
2 Energieversorgung
3 Steuerung
4 Scanner-System
5 Produktzufuhr
6 Produktabfuhr
7 Technologische Einrichtung für Produktbestrahlung
8 Abschirmung
9 Sicherheitssystem

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Anlage GSE 80
(Quelle: Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH)

2.4 Methodik der biomechanischen Untersuchungen

Nach der Sterilisation wurden die BPTB-Transplantate bis zur Durchführung der biochemischen Untersuchungen bei - 80 °C für eine Woche gelagert. Vor Beginn der Testreihen wurden die Proben aus der Tiefkühltruhe genommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Während des Auftauens, der Präparation und Versuchsaufbaus wurden die Proben in mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchteten Kompressen gewickelt, um eine Dehydratation des Sehnengewebes zu verhindern. Die biomechanischen Tests an den BPTB-Transplantaten erfolgten mit einer Materialprüfmaschine (Modell 1455, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland). Der Testaufbau bestand aus der Materialprüfmaschine zur Applikation der Prüfkraft, dem eigentlichen Sehnenprüfstand, in dem die Präparate montiert wurden und einem optischen System zur Messung der resultierenden Bewegung der Sehne (Abb. 13).



Abbildung 13: Zwick-Materialprüfmaschine Typ 1455 u. Aufbau der optischen Kameras

2.4.1 Einbettungen der Sehnentransplantate

Die Einbettung der BPTB-Transplantate diente der Fixierung der Knochenblöcke, damit eine Bewegung nur noch in den zu testenden Sehnen möglich war. Die Eingusstöpfe wurden vor der Einbettung mit Vaseline gefettet, um ein Anheften der Beracryl-Präparat-Verbindungen im Einbettungstöpfchen und damit eine mögliche Schädigung der Präparate beim Entfernen zu vermeiden. Als Einbettmedium wurde Polymethyl-methacrylat (PMMA, Technovit 3040; Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts, Deutschland), ein aus zwei Komponenten bestehender, schnell härtender Kunststoff, verwendet. Zur Fixation wurde in einem separaten Messbecher das Beracrylpulver mit dem Monomer im Verhältnis von 1:1 gemischt und vorsichtig in den Testtopf gegossen, so dass nur noch das obere Drittel des Femuranteils frei war. Nach vollständiger Aushärtung des Beracryls erfolgte die Einbettung des Tibia-Präparatanteils. Hierzu wird der Testtopf mit dem fest verbundenen Präparat kopfüber gedreht und über eine Einbetthilfsvorrichtung in den zweiten Testtopf eingebracht (Abb. 14). Die gesamte Einbettung dauert 30 Minuten pro Seite. Nach der korrekten Positionierung des Femuranteils und des Tibia-Anteils wurde dieser ebenfalls in den Prüfstand eingebracht. Die Präparate wurden während des gesamten Einbettungsvorgangs mit einer 0,9%-igen NaCl-Lösung feucht gehalten.

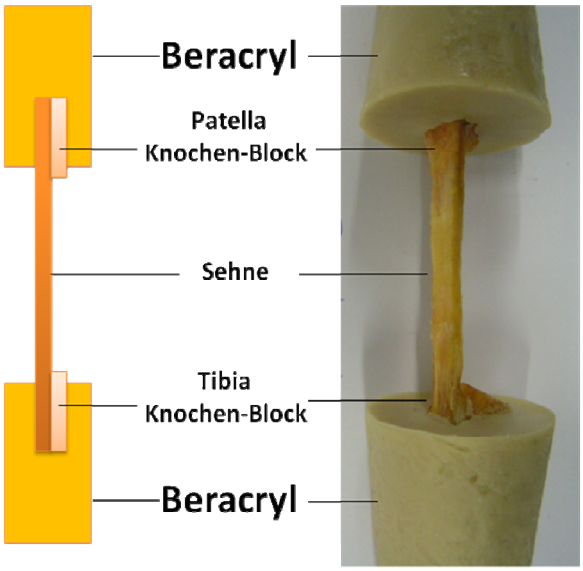


Abbildung 14: Eingebettetes BPTB-Transplantat

2.4.2 Testablauf

Das Modell aus Knochen und Fixationsmaterial wurde in 10 Zyklen mit einer Kraftzwischen 0 und 20 N und einer Geschwindigkeit von 150 mm/min präkonditioniert. Nach dieser Vorkonditionierung wurde das Modell über eine zyklische Belastung bis zum Versagen mit einer Geschwindigkeit von 150 mm/ min weiter belastet (Abb. 15). Steifigkeit und maximale Versagenskraft des Modells wurden mittels eines Rechners und einer Prüfsoftware (testXpert V 11.0, Zwick, Ulm, Deutschland) kontinuierlich aufgezeichnet aufgezeichnet und die resultierende Last-Elongationskurve auf die beschriebenen Parameter hin analysiert.

Die Steifigkeit wurde als größte Steigung des linearen Teiles der Last-Elongationskurve definiert. Die Versagenslast wurde als der Punkt der Last-Elongationskurve, an dem die Kraft nicht mehr linear zunimmt, definiert. Die Maximallast wurde als der Punkt der Last-Elongationskurve definiert, an dem die höchste Kraft gemessen wurde. Die Bewegung der Transplantate wurde während der zyklischen Belastungen mit einem optischen Messsystem (MacReflex, Qualisys Inc, Partille, Schweden) zur Ermittlung des Dehnungsverhaltens quantifiziert. Die von der optischen Einrichtung aufgezeichneten Rohdaten mussten nach der Messung auf Erkennungsfehler hin untersucht werden. Hierbei wurde jede Messung in einer speziellen Nachbereitungssoftware (Camerawise Tracker, Qualisys Inc., Gothenburg,

Schweden) gesichtet und eine eventuell aufgetretene Vertauschung der Markerpunkte 1 bis 6 korrigiert. Danach erfolgte ein Datentransport in das Excel 97-Format, so dass eine weitere Auswertung mittels handelsüblicher Software möglich wurde. Die Testauswertung beinhaltete verschiedene Arbeitsschritte. Diese umfassten die Erfassung der Messdaten durch das optische System bis zur graphischen Darstellung der Auslenkungsergebnisse. Im Anschluss an die Rohdaten Aufzeichnung durch die zwei Kameras erfolgte der Vorgang des „Trackings“. Hierbei wurden mittels der MacReflex®-Software aus den zwei separaten 2D-Bildern die 3D-Koordinaten berechnet. Danach wurden diese während des sogenannten „Exportierens“ in eine Excel-kompatible Datei konvertiert. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Auswertung der Daten mittels eines Excel-Programms welches die MacReflex-Daten so auswertete, dass die Daten als Auslenkung in Grad über den Zeitraum der gesamte Messzyklen dargestellt werden konnten. Als Abschluss erfolgte die graphische Umsetzung der Auslenkung, was das Ablesen der Werte für den 200 Testzyklus ermöglichte.

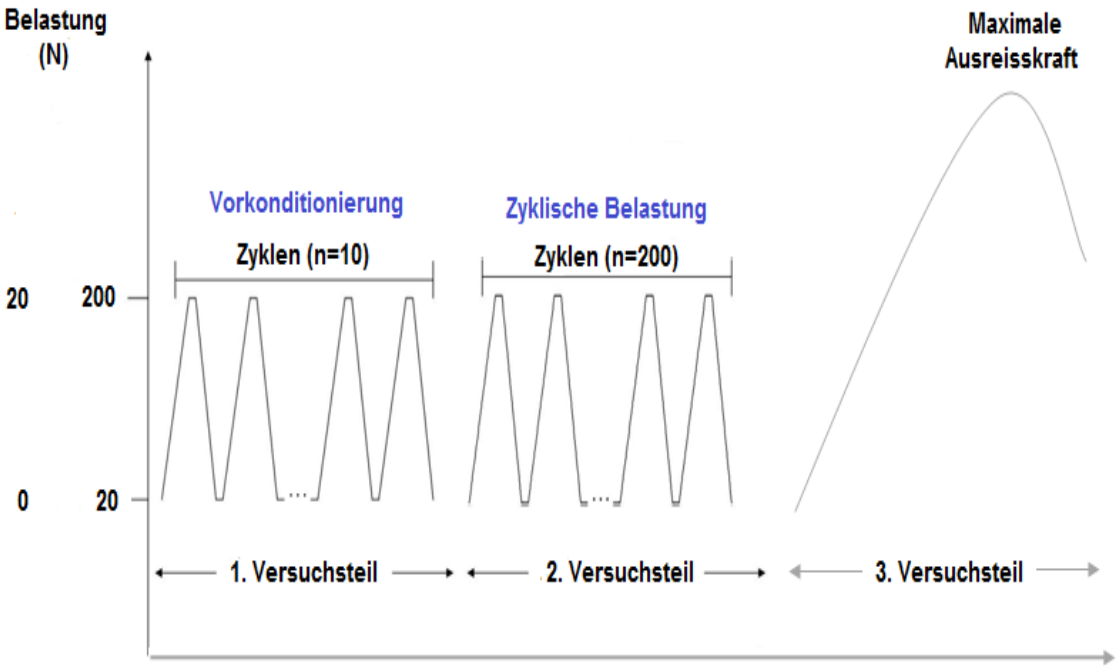


Abbildung 15: Graphische Darstellung des Testablaufs

2.4.2.1 Optische Messsysteme

Die Sehnenbewegungen wurden mittels eines optischen infraroten 3D-Messystems MacReflex Motion Capture System (Qualisys Inc., Gothenburg, Schweden) erfasst und aufgezeichnet. Dieses bestand in unseren Versuchen aus zwei Kameras mit Stativ, einem Echtzeitkontrollmonitor, einem PC-System mit den dazugehörigen Verbindungskabeln und aus sechs Messpunkten mit festen reflektierenden Markern. Zwei Marker wurden in der Sehne, zwei Marker an den knöchernen Sehnenansätzen und zwei Marker an den Klemmen aus Aluminium befestigt (Abb. 6), in ihren Bewegungen durch die zwei Infrarotkameras (Qualisys Inc., Gothenburg, Schweden) verfolgt und aufgezeichnet (Abb. 17). Alle Veränderungen der Präparate während der zyklischen Belastungstests wurden durch die Position der Marker mit Hilfe einer Qualisys Tracker in 3D-Koordinaten berechnet. Somit war das optische Messsystem geeignet, speziellen, über die Kameras erfassten Markerpunkten Raumkoordinaten zuzuweisen und die Bewegungen der Markerpunkte im Koordinatensystem zu verfolgen. Zu diesem Zweck wurden reflektierende Marker (prophysics AG, Zürich, Schweiz) mit Infrarot LDEs angestrahlt und die Reflexion von den Kameras aus zwei Perspektiven aufgezeichnet. Eine räumliche Messanordnung und Kalibrierung des Systems ist notwendig, um eine Genauigkeit von ≤ 0.05 % zu gewährleisten.

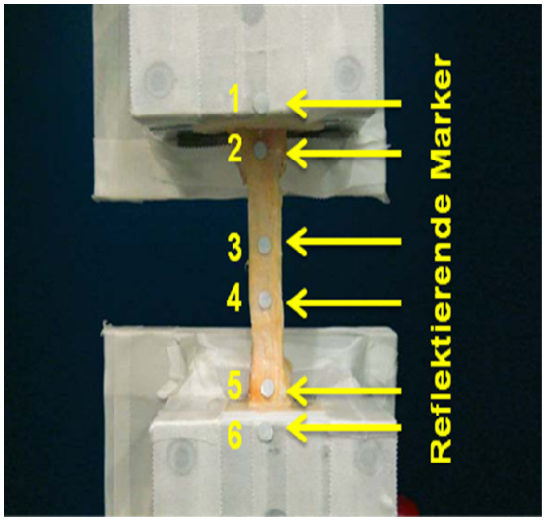


Abbildung 16: Befestigung der Marker an den BPTB-Präparaten



Abbildung 17:Optisches 3D-Messsystem

2.4.2.2 Räumliche Messanordnungen und Kalibrierung

Alle Testungen wurden mit derselben räumlichen Anordnung durchgeführt. Die beiden Kameras wurden jeweils in einem Abstand von 160 cm und in einer Höhe von 140 cm zum BPTB–Prüfstand aufgestellt. Die Ausgangsposition der Traverse war immer die vertikale Nullposition des Messgerätes (Abb. 18). Beim Arbeiten mit dreidimensionalen Messungen musste das Kamerasystem zunächst kalibriert werden, da die Raumpositionen der Kameras dem System unbekannt sind. Hierbei wird die Kalibrierung unter Verwendung einer Referenzstruktur, dem sogenannten Kalibrierungsrahmen durchgeführt. Der Kalibrierungsrahmen ist eine dem Messvolumen entsprechende, stabile Konstruktion mit 6 Markern, deren exakt vermessene Positionen dem System bekannt sind. Die Genauigkeit der Messung hing direkt von der Präzision der vorangehenden Kalibrierung des Optischen Messsystems ab. Es ist möglich durch die exakte Einhaltung eines immer gleich bleibenden Versuchsaufbaus bzw. der räumlichen Versuchsanordnung sowie der standardisierten Systemkalibrierung eine Messungenauigkeit von maximal 5% zu erreichen.

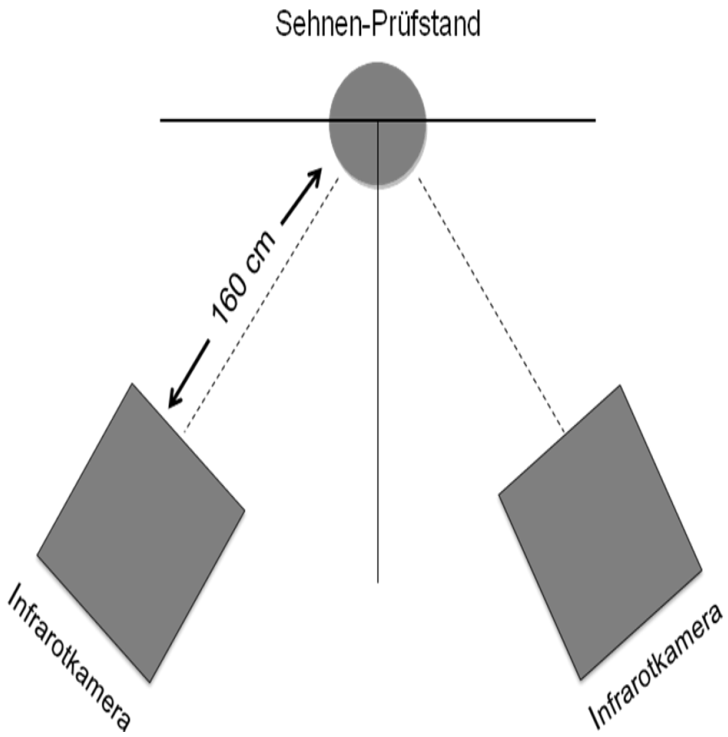


Abbildung 18: Schema der Kameraposition in Relation zum Testobjekt

2.5 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.5.1 Studiendesign

Für die Tierversuche lag eine Genehmigung durch die zuständige Behörde, des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin, unter Tierversuchsvorhaben G0137/08 vor. Die Studie erfolgte an 24 ausgewachsenen, weiblichen Merino-Mix-Schafen, bei denen ein Ersatz des vorderen Kreuzbandes am linken Hinterlauf durchgeführt wurde. Die Rekonstruktion des VKB erfolgte mit einem freien allogenen, nicht sterilisierten (n=6) bzw. einem mit Electron Beam (E-Beam) behandelten (n=18) Sehnentransplantat des Musculus flexor digitalis superficialis. Die Transplantate wurden extrakortikal femoral über einen Endobutton sowie tibial über eine Faden-Knochenbrücke fixiert (Abb. 20e). Als Kontrollgruppen dienten zusätzlich die Ergebnisse einer Vorstudie, in der am identischen Tiermodell der Remodelingprozess von autologen (n=12), sowie tiefgefrorenen allogenen (n= 7) Flexorsehnentransplantaten untersucht wurde (Scheffler et al., 2008). Diese Studie war ebenfalls durch die staatliche Behörde (Antragsnummer G0073/02) genehmigt worden. Die Standzeiten der Tiere betrugen in beiden Studien 6 und 12 Wochen (Tab.3). Die 6 Wochenzeit-Punkte repräsentierten das frühe Remodeling mit einem in der Literatur beschriebenem Maximum an zellularen Umbauvorgängen in den äußeren Transplantatregionen und einer beginnenden Revaskularisierung.

Tabelle 3: Postoperative Standzeiten der E-Beam-Allografts, Autografts und VKB nativ $^{+}$vorhergehende vergleichbare Studie der Arbeitsgruppe (Scheffler et al., 2008)

Standzeiten	E-Beam-Allografts	Allografts - unsterilisiert	$^{+}$Allografts - unsterilisiert	$^{+}$Autografts-unsterilisiert	VKB nativ
6 Woche	9	3	3	5	7
12 Woche	9	3	4	7	
Summe	18	6	7	12	7

Der zweite Untersuchungszeitpunkt nach 12 Wochen diente der Evaluation des Fortschreitens sowie der Dynamik des Remodeling, da zu diesem Zeitpunkt ein sich in allen Regionen im Umbauprozess befindendes Transplantat mit beginnender Konsolidierung und Proliferation zu erwarten war. Im Rahmen dieser Studie erfolgten Röntgenverlaufsuntersuchungen direkt postoperativ sowie, nach der Tötung der Tiere, in 2 Ebenen. Die biomechanischen Versuche

beinhalteten Testungen zur Ermittlung von Bandlaxizität, Steifigkeit und der Versagenskraft. Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene weitere Teilaspekte des Remodelings histologisch von weiteren Doktoranden untersucht. Dazu gehörten die Evaluation der Zell-Gefäß- und Myofibroblastendichte, eine Kollagenanalyse sowie eine histologische, deskriptive Untersuchung des Remodelings.

2.5.2 Versuchstiere

In unserer Studie verwendeten wir ausgewachsene, weibliche Merino-Mix- Schafe im Alter von zwei bis drei Jahren und einem durchschnittlichen Gewicht von 70 kg. Alle Versuchstiere kamen von einem zertifizierten Züchter (Karin Bildt, Gutshof Langerwisch, 14552 Michendorf). Vor ihrer Aufnahme in die Versuche erfolgten in Quarantäne eine klinische Untersuchung sowie eine Feststellung des Alters durch einen Tierarzt. Tiere, mit Störungen des Allgemeinbefindens, trächtige Tiere sowie nicht altersgerechte Tiere, kamen nicht in die Versuchsserie. Daneben erfolgte eine präoperative Röntgenkontrolle der Kniegelenke in zwei Ebenen (anteroposteriorer und seitlicher Strahlengang) zum Ausschluss von offenen Wachstumsfugen. In den Versuch aufgenommene Tiere wurden durch eine Ohrmarke gekennzeichnet und erhielten ein Antiparasitikum (Ivomec SR, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) sowie ein Immunstimulans (Ivomec S®, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland). Prä- und postoperativ wurden die Tiere in den tierexperimentellen Einrichtungen des Forschungshauses der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin unter veterinärmedizinischer und tierpflegerischer Aufsicht untergebracht.

2.5.3 Tiermodell Schaf

Das Kniegelenk von Schafen ist auf Grund seiner anatomischen und funktionellen Ähnlichkeiten zum menschlichen Kniegelenk als Tiermodell für Rekonstruktionen des VKB gut geeignet (Hunt et al., 2005). Die Größe der Tiere erlaubt eine genaue Platzierung der Knochentunnel. Die Entnahme der Sehne des M. flexor digitalis superficialis führt nicht zu funktionellen Einschränkungen, und die Tiere erlangen die normale Belastbarkeit im operierten Kniegelenk bereits nach etwa 3-4 Wochen. In entsprechenden Studien wurden keine Knieinstabilitäten, Bewegungseinschränkungen oder Zeichen einer Arthrose festgestellt werden. Des Weiteren wurden Schafe bereits in zahlreichen Studien zum VKB- Ersatz verwendet, was eine Vergleichbarkeit der Daten mit der Literatur zuließ (Petersen et al., 2003; Unterhauser et al., 2003; Weiler et al., 2001; 2002/a; 2002/b).

2.5.4 Transplantatauswahl

Da die Hamstringsehnen des Schafes eine eher flächige und faszienähnliche Gestalt haben, eignen sie sich nicht als Kreuzbandtransplantate. Deshalb verwendeten wir die Sehne des M. flexor digitalis superficialis, deren Entnahme operativ einfach ist und von den Schafen außerordentlich gut toleriert wird (Hunt el at. 2005**)**. Daneben weist diese Sehne ähnliche biomechanische Eigenschaften wie die Hamstringsehnen auf (Abb. 19 A/B). Die in den Tierversuchen verwendeten Flexorsehnen wurden von Spenderschafen mit gleichem Alter und Geschlecht entnommen. Um eine Vergleichbarkeit zu der vorangegangen Studie zu ermöglichen, erfolgte bei jedem Empfängertier ebenfalls eine Transplantatentnahme.

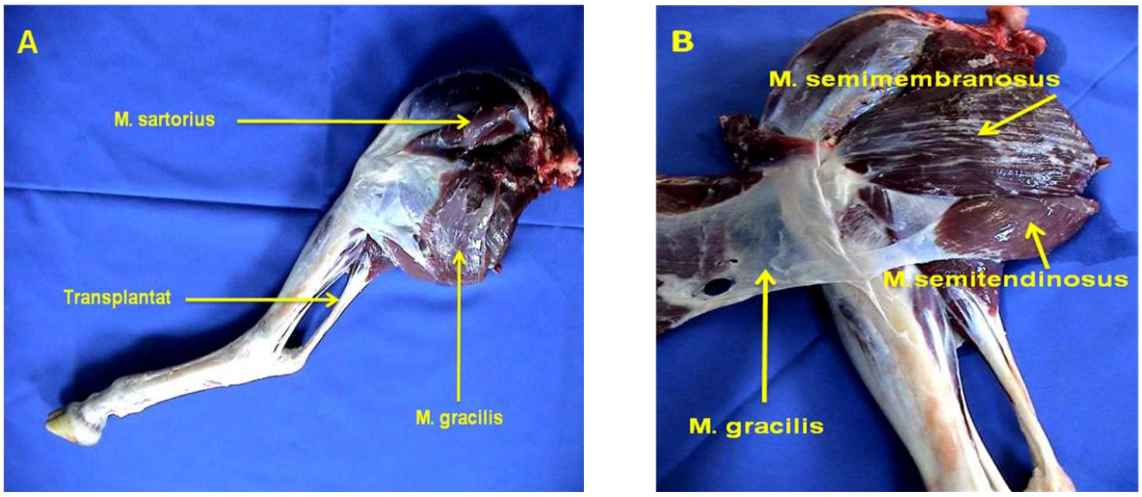


Abbildung 19: Übersicht der hinteren Extremität des Schafes A) mit flächiger gemeinsamer Sehne des M. gracilis und M. sartorius; B) Nach Umklappen des M. gracilis kommt die flächige und kurze Sehne des M. semitendinosus zum Vorschein

2.5.5 Transplantatvorbehandlungen

Die Sehnen des M. flexor digitalis superficialis wurde sofort nach ihrer Entnahme bei -20°C gelagert**.** Die anschließende E-Beam Bestrahlung der Präparate erfolgte bei der Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH (Radeberg, Deutschland) mit 34 kGy unter CO_2 Zugabe und bei -70 °C in mit Trockeneis gefüllten Polystyrol-Boxen. Die exakten Bestrahlungsdosen wurden anhand mit Dosimetern gemessen und in einem Dosimetriebericht dokumentiert und überprüft. Nach der Bestrahlung wurden die Sehnen für mindestens 1 Woche bei -80°C gelagert, bevor sie transplantiert wurden. Das erfolgte, da bekannt ist, dass es während dieser Zeit zu einer Reduktion der durch die Bestrahlung entstandenen Radikale kommt.

2.5.6 Operationen

2.5.6.1 Prämedikation, Narkose und Analgesie

Den Tieren wurde vor Beginn der Operation eine Braunüle in die Vena cephalica appliziert. Über diese erfolgt eine Narkoseeinleitung mit 1000-1500 mg Thiopental (Trapanal®,Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz,Deutschland). Danach erfolgte die Intubation mit Hilfe eines Laryngoskops mit langem, geradem Spatel (FOREGGER) mit einem Endotrachealtubus Char. 8-9 (Hi-Lo LanzTM Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland). Vor Beginn der Operation erhielten die Tiere eine One-shot Antibioseprophylaxe mit Amoxicillin und Clavulansäure i.v. 2,2g (Augmentan®, SmithKline Beecham GmbH) und während der Operation erfolgte eine Infusion mit Sterofundin (Natriumchlorid-Infusionslosung 154, Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland) . Zur Vermeidung einer zu starken Aufgasung, wurde den Tieren eine Magensonde gelegt. Die Narkose wurde mit Hilfe eines Inhalators (Ventilator 711, Siemens-Elema Ab, Solna, Schweden) und eines Gasgemisches aus Isofluran (Forene®, AAbbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und Lachgas (1,5%, 1/3 O_2, 2/3 N_2) durchgeführt. Die Tiere wurden intraoperativ mit einer Frequenz von 16-18 Zügen mit 6-8 l/min beatmet. Da Isofluran nur eine geringe analgetische Wirkung besitzt, erfolgte intraoperativ eine halbstündliche additive Analgesie mit je 0,5 mg Fentanyl® (Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Zur Narkoseüberwachung dienten ein Pulsoximeter, die expiratorische CO_2-Messung und ein EKG. Nach Beendigung der Narkoseeinleitung wurden der linke Hinterlauf, ein Teil des Beckens und des Bauches enthaart, gewaschen und mit Polyvidonjod-Lösung desinfiziert (Desderman®, Schulke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Anschließend erfolgte in Rückenlagerung eine Fixation der Tiere auf dem OP-Tisch. Die Operation wurde unter standardisierten sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Blutstillung verwendeten wir eine monopolare Elektrokoagulation, als Spülung wurde 0,9% NaCl-Lösung (Delta select GmbH, Pfullingen, Deutschland) verwendet.

2.5.6.2 Transplantatentnahme

Nach einem ca. 10 cm langen longitudinalen Hautschnitt am linken Hinterlauf wurde die Sehne des M. gastrocnemius, welche in derselben Sehnenscheide mit der Sehne des M. flexor digitalis superficialis verläuft, dargestellt. Nach Eröffnung der Sehnenscheide erfolgte die Präpararation der Flexorsehne mit Hilfe einer Overholtklemme. Anschließend wurde proximal

des Tuber calcanei und distal des Muskelbauches ein 6 bis 8 cm langes und ca. 7 mm breites Transplantat scharf herausgetrennt. Die inzidierte Sehnenscheide wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial (1/0 Vicryl®, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) und die Haut mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (2/0 Prolene®, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Das Transplantat wurde mit 0,9% NaCl-Lösung getränkten Mullkompressen steril und feucht gehalten und anschließend auf -80°C tiefgefroren.

2.5.6.3 Präparation

Die bereits von anderen Tieren gewonnenen Transplantate wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und bis zu ihrer Verwendung mittels kochsalzgetränkter Tücher feucht gehalten.



Abbildung 20: Transplantat in Baseball-stitch-Technik präpariert

Anschließend wurden proximal und distal in Baseball-stitch-Technik aus zwei nicht-resorbierbaren, mit Polyester beschichteten Fäden (Ethibond-Excel®, Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) der Stärke 2-0 je 2 zirkuläre Schlingen angebracht, um den Sehnendurchzug durch die Bohrkanäle zu erleichtern (Abb. 20). Anschließend wurde das so präparierte Transplantat manuell vorgespannt und dessen Durchmesser für den späteren Bohrkanal gemessen.

2.5.6.4 Arthrotomie und Transplantatverankerung

Nach einem 10-12 cm langen Hautschnitt medial des Lig. patellae erfolgte nach Durchtrennung der Verschiebeschichten die Eröffnung der Gelenkkapsel (Abb. 21, a). Über eine Inzision des M. vastus medialis und des patellofemoralen Bandes konnte die Patella nach lateral luxiert und der Gelenkraum eröffnet werden. Zur besseren Darstellung wurde der

Hoffa´sche Fettkörper unter Schonung des Lig. transversum genus medialseitig gelöst und nach lateral geschlagen. Dann wurde das originäre VKB herausgetrennt und die Insertionsstellen mit Hilfe eines scharfen Löffels und einer Luer-Zange debridiert (Abb. 21, b). Zur Transplantatverankerung wurden femoral und tibial, ausgehend von den ursprünglichen VKB-Fixationen nach inside-out-Technik, dem Transplantat entsprechende und 20 mm tiefe Knochentunnel aufgebohrt.

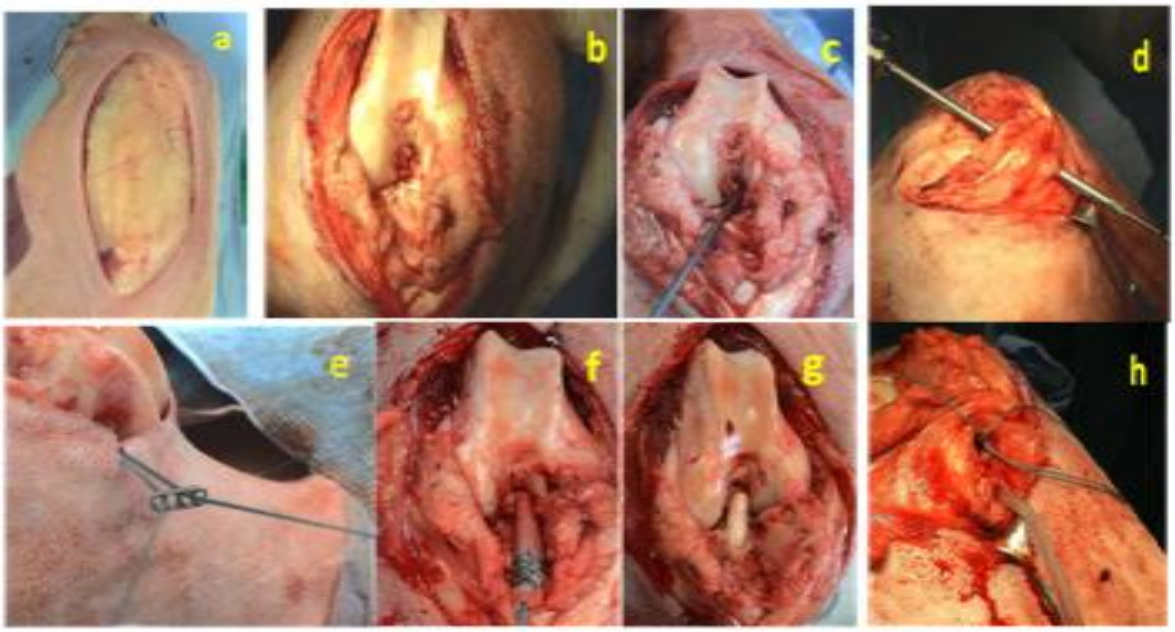


Abbildung 21: a) anteromediale Arthrotomie; b) debridierte Insertionstelle des VKB; c) Bohrung des femoralen Knochentunnels; d) Bohrung des tibialen Knochentunnels; e) femorale Verankerung mit einem Endobutton; f) und g) Einziehen des Transplantates; h) tibiale Verankerung über eine Knochenbrücke

Dabei erfolgte die Bohrung des femoralen Tunnels in maximaler Flexion des Kniegelenkes vom ehemaligen Ursprung des VKB in der Fossa intercondylaris (Notch) ausgehend in Richtung Epicondylus lateralis. Zur höheren Präzision diente ein vorher bis durch die Haut gebohrter Führungsdraht (Abb. 21 c). Tibial verlief der Knochentunnel von der alten Insertionsstelle des VKB medial von der Eminentia intercondylaris bis durch die Gegenkortikalis medial der Tuberositas tibiae (Abb. 21 d). Dabei galt es, eine zu weit nach anterior gelegte Platzierung des tibialen Bohrkanals zu vermeiden, da dies zu einer schädigenden Beeinflussung des Transplantates und zur sekundären Transplantatelongation, ggf. auch zu einem Transplantatversagen führen kann (Strobel, 1998). Eine Knochenbrücke für die spätere, distale Fixation des Transplantates wurde mit Hilfe eines weiteren Bohrloches

bis in die Spongiosa im großzügigen Abstand medial des distalen Knochentunnels gebildet (Abb. 21 h). Die Transplantate wurden danach über die an den Sehnenenden angebrachten Haltefäden mit Hilfe eines Führungsdrahtes von innen nach außen in die Knochentunnel gezogen (Abb. 21 f, g). Nach proximaler, femoraler Fixation über einen extrakortikalen Endobutton (Acufex®, Smith & Nephew Endoscopy Inc., Ma, USA) wurde nach mehrmaligem Durch bewegen des Gelenkes das distale Transplantatteil unter maximaler Vorspannung in 30° Flexion in derselben Technik über der tibialen Knochenbrücke befestigt (Abb. 21 e; Abb. 22)

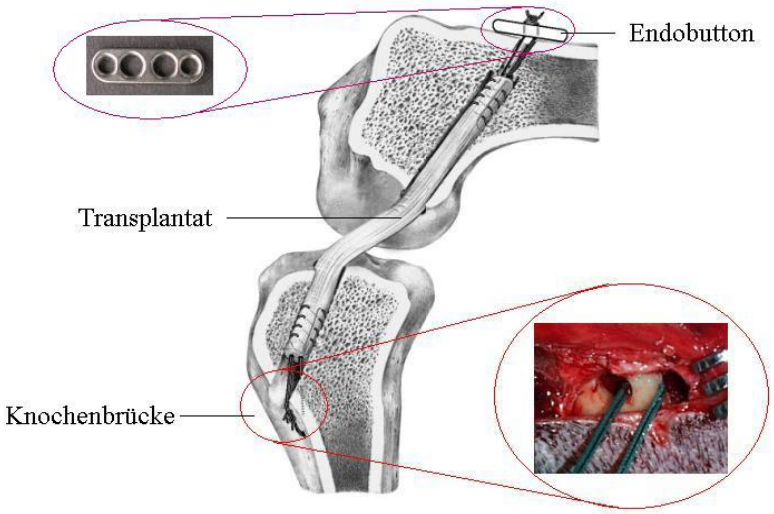


Abbildung 22: Indirekte Transplantatfixation distal mittels Knochenbrücke und proximal über einen Endobutton

Nach Reposition der Patella wurden die Beweglichkeit und Fixation des Transplantes durch erneutes Durchbewegen getestet. Anschließend wurde das patellofemorale Band zur Vermeidung von postoperativen Patellaluxationen mit resorbierbarem Nahtmaterial refixiert. Es folgte der Kapsel- und der schichtweise Wundverschluss ebenfalls mit resorbierbarem Nahtmaterial (1/0 Vicryl® Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Nach Hautverschluß wurden die Wunden erneut mit Braunol® 2000 desinfiziert (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und mit einem Verband versehen. Anschließend wurden kraniokaudale und mediolaterale Röntgenbilder (Mobilett Plus, Siemens-Elema AB, Solna, Schweden) zur Kontrolle des Transplantatsitzes und der Knochentunnel angefertigt. Zur postoperativen Analgesie wurde bei den Tieren ein Fentanylpflaster 100 (Durogesic ®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland, 100 µg) an der linken Vordergliedmaße proximal auf der vorher rasierten Haut aufgebracht.

2.5.6.5 Postoperative Nachsorge

Um Wundinfektionen, übermäßige Bewegung und Beeinträchtigung durch die anderen Schafe vorzubeugen, kamen die operierten Tiere für einen Tag zur Überwachung in eine Einzelbox. Als zusätzliche Schmerzprophylaxe wurde bis zum 3. postoperativen Tag 1x täglich Analgetika (Finadyne® 25 mg Injektionslösung 1 %, Essex Pharma GmbH, Münschen, Deutschland) verabreicht. Die Schafe befanden sich in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité unter veterinärmedizinischer und tierpflegerischer Aufsicht und wurden täglich visitiert. Nach regelmäßigem Verbandswechsel, Beurteilung des Lahmheitsgrades und Inspektion der Wunde wurden zwischen dem 10.-14. postoperativen Tag die Fäden gezogen und die Tiere bis zur Tötung auf das Gelände des Instituts verbracht. Alle Schafe wurden regelmäßig auf Bewegungseinschränkungen und Infektionen untersucht und die Klauen auf Grund der fehlenden Abnutzung auf dem weichen Boden in 6-wöchigem Abstand geschnitten.

2.5.6.6 Transplantatentnahme

Nach 6 und 12 Wochen Standzeit wurde jeweils die Hälfte der Schafe getötet. Dazu wurden sie mit 30 mg/kg Thiopental-Natrium® (Trapanal, Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland) über einen Venenkatheter in der V. cephalica narkotisiert. Anschließend trat nach Applikation von 50 ml Kaliumchlorid i.v. (1M-Kaliumchlorid-Lösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) unter Auskultationskontrolle der Herztätigkeit der Herzstillstand ein. Nach Entnahme der kontralateralen, nativen Sehne des M. flexor digitalis superficialis rechts als auch des nativen VKB rechts für Kontrolluntersuchungen, wurden die operierten linken Kniegelenke mit den darin befindlichen Transplantaten in toto explantiert. Es erfolgte zunächst eine Röntgenkontrolle in 2 Ebenen (antero-posteriorer und seitlicher Strahlengang). Anschließend wurde das Kniegelenk auf äußere Veränderungen (Schwellungen, Bewegungsumfang) untersucht und danach in toto entnommen. Dazu wurden mit Hilfe einer Knochensäge Femur und Tibia ca. 15 cm proximal und distal der Kniegelenke abgesetzt. Die Gelenke wurden in 0,9% NaCl-getränkte Binden eingelegt, um einem Austrocknen vorzubeugen, und es erfolgte die Einbettung der Kniegelenke an den Femur- und Tibiastümpfen in Beracryl-Kunststoff-Gussformen (Beracryl® Pulver, Troller-Kunsstoffe AG, Fulenbach, Schweiz) Nach der

Eröffnung des Gelenkes erfolgte eine Untersuchung nach Zeichen von Arthrose, Gefäßinjektionen, Entzündungszeichen und Synovialschäden

2.5.7 Biomechanische Testung

Die biomechanischen Untersuchungen erfolgten an einer Zwickmaschine (Materialprüfung Modell 1455, Zwick GmbH & Co.KG, Ulm, Deutschland). Diese Maschine erlaubt Testung unter Zug, Kompression und Rotation. In der vorliegenden Arbeit führten wir Testung ausschließlich unter uniaxialer Zugbelastung durch. Die Messgenauigkeit für uniaxiale (vertikale) Translation betrug 0,005 mm. Die Materialtestmaschine arbeitete mit einer Kraftzelle von 20 KN und einer Messgenauigkeit von ± 0,12 %. Alle Messdaten wurden auf einen vernetzten Personal- Computer übertragen und gespeichert. Von allen Präparaten und Transplantaten wurden an biomechanischen Parametern die Steifigkeit, die maximale Versagenskraft und Elongation ermittelt.

2.5.7.1 Versuchsaufbau

Die operierten Kniegelenke wurden an den mit Beracryl® eingebetteten Femur- und Tibiastumpfen in zwei Aluminiumklemmen fixiert. Dabei wurde der Femur in 60° Beugung zur Langsachse der Tibia positioniert, um eine der Schafsanatomie entsprechende und möglichst homogene Kraftverteilung über den Kreuzbandquerschnitt zu gewährleisten (Abb. 23). Die erste Testung erfolgte mit dem intakten Weichteilmantel. Die Tibia wurde auf dem beweglichen Tisch der Zwickmaschine fixiert, der eine Bewegung in vertikaler Richtung erlaubt. Die biomechanische Testung fand unter Zulassung nur eines Freiheitsgrades statt. Somit waren sowohl Translationsbewegungen nach medial-lateral und proximal-distal als auch sämtliche Rotationsbewegungen nicht möglich. Vor dem Festlegen der Ausgangs- bzw. Nullstellung von Femur und Tibia für den Schubladentest wurde kontrolliert, dass kein ossarer Kontakt zwischen den femoralen Kondylen und dem tibialen Plateau bestand. Die Nullstellung wurde durch eine Bewegung der Tibia bis zu einer Vorlast von +5 N nach anterior festgelegt. Zum Wiederfinden dieser Nullstellung nach jedem Belastungszyklus wurde ein Metallblock am Wegaufnehmer der Zwick platziert.

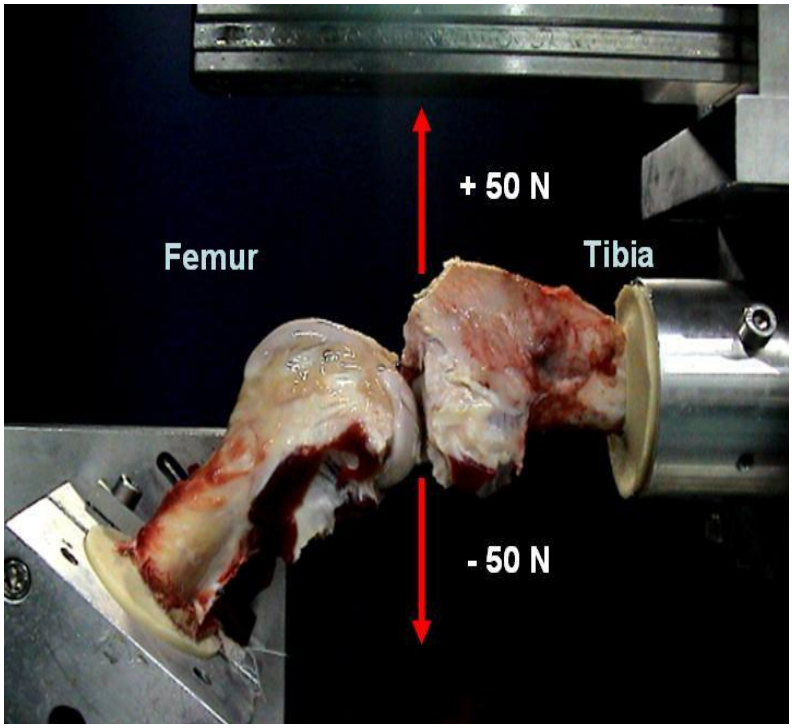


Abbildung 23: Modifizierter Schubladentest beim Schaf in 60°-Flexion

2.5.7.2 Test-Protokoll

Jedes operierte Kniegelenk wurde vier biomechanischen Testungen unterzogen. Alle Testungen wurden schriftlich und photographisch dokumentiert. Zuerst wurde das operierte Kniegelenk mit seinem Weichteilmantel (Muskelmantel, Kniegelenkskapsel, kompletter Bandapparat, Menisken) einer Simulation der vorderen und hinteren Schublade mit einer Relativbewegung der Tibia gegenüber dem Femur in 60° Beugung getestet. Die Geschwindigkeit der antero-posterioren Translationsbewegung betrug 120 mm/sec. Der Belastungsmodus war auf ein Maximum von +50 N und -50 N festgelegt und die initiale Nullstellung definierte sich bei einer nach anterior gerichteten Vorlast mit der Größe +5 N. Diese wurde am Ende der ersten Testzyklen wieder eingenommen. Insgesamt erfolgten 11 Zyklen, wobei die ersten 10 Zyklen zur Vordehnung dienten. Von allen Zyklen wurde ein Kraft-Strecke-Diagramm gespeichert, wobei sich alle Berechnungen auf den 11. Testzyklus bezogen. Danach erfolgte die Resektion des kompletten Streckapparats (Weichteilmantel, Kollateralbänder, Kapselstrukturen, Menisken) , so dass letztlich die Allografts und das native

hintere Kreuzband (HKB) als physikalische Verbindung zwischen Femur und Tibia verblieben. Aus den eröffneten Kniegelenken erfolgte unter sterilen Kautelen die Entnahme von Synovialflüssigkeit für bakteriologische Untersuchungen. Das Innere der Kniegelenke wurde makroskopisch auf Entzündungszeichen (Gefässinjektionen der Synovialis, Gelenkergussbildung und Synovialishypertrophie) und Ausbildung einer neuen synovialen Hüllschicht um das Allograft beurteilt und photographisch dokumentiert. Danach wurde entsprechend dem ersten Test mit denselben Parametern (Belastungsmodus mit max. +50 N und min. -50 N bei 120 mm/sec) eine Simulation der vorderen und hinteren Schublade in 60° Beugung gefahren. Erneut wurden alle Daten der 11 Zyklen gespeichert und das Kraft-Strecke-Diagramm des 11. Zyklus für die Berechnungen verwendet. Danach wurde das native HKB durchtrennt und das VKB-Transplantat auf seine biomechanischen Eigenschaften mit Hilfe einer Simulation ausschließlich der vorderen Schublade getestet. Der Belastungsmodus beinhaltete ein Maximum von +50 N bei einer Geschwindigkeit von 120 mm/sec. Von einer initialen Nullstellung mit einer Vorlast von +1 N startend, erfolgten 11 Zyklen mit einer relativen Translationsbewegung der Tibia gegenüber dem Femur. Alle Daten wurden gespeichert und ein Kraft-Strecke-Diagramm des 11. Testzyklus ausgedruckt.

Für den Versagenstest (load-to-failure) wurde das Kniegelenk in anatomischer Ausrichtung erneut in 2 Aluminiumklemmen in 90° Beugung fixiert (Abb. 24). Dann wurde das VKB Transplantat mit einer parallel verlaufenden Kraft und einer Prüfgeschwindigkeit von 120 mm/sec bis zum Versagen belastet. Dabei wurde eine Kraft-Dehnungskurve aufgezeichnet sowie Versagenskraft und -modus (Versagen der Verbindungs-materialien und intraligamentäre Ruptur) der Allografts dokumentiert.

Aus den Daten der Kraft-Strecke-Diagramme wurden Steifigkeit und AB-Laxizitat (Elongation) berechnet. Aus den ersten drei Testungen (1. Knie komplett, 2. VKB-Transplantat und HKB nativ, 3. VKB-Transplantat) wurden die Daten des 11. Messzyklus genutzt. Die Berechnung der Steifigkeit erfolgte bei 50 N- und 20 N-Belastung nach folgender Formel:

Steifigkeit(N/mm) $\frac{Y(50\,N) - y(20\,N)}{X(50N) - X(20\,N)}$ y-N, X-mm

Zur Beurteilung der gesamten Laxizitat wurde die Elongation bei +50 N und bei -50 N addiert. Bei der dritten Testung, bei der nur noch das Allograft getestet wurde, lag die maximale Elongation bei +50 N. Die Steifigkeit im Versagenstest wurde als die Steigung der Kraft Strecke-Hysteresekurve im Bereich zwischen 20% und 90% der endgultigen Versagenskraft definiert:

Steifigkeit (N/mm): $\frac{N(90\%) - N(20\%)}{mm(90\%) - mm(20\%)}$ N- Versagenskraft

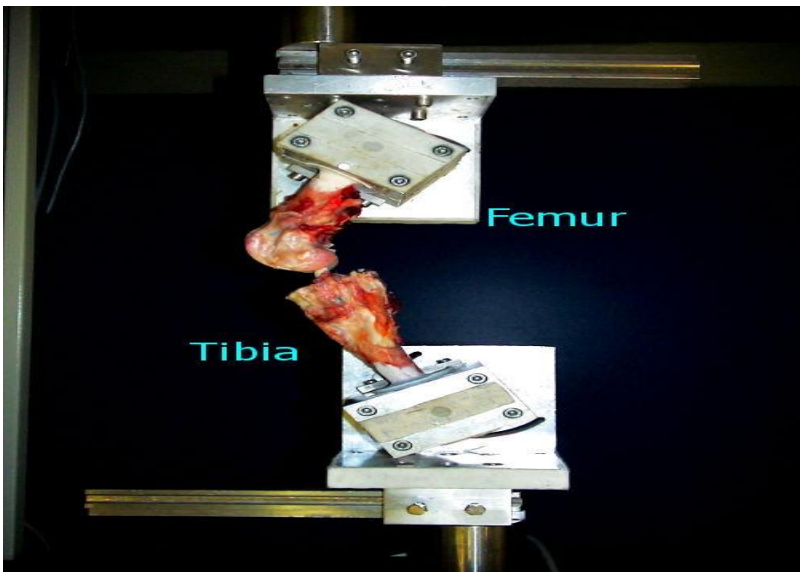


Abbildung 24: Testanlage für den Versagenstest

2.6 Statistische Analysen

Zur Aufzeichnung und Speicherung des Kraft-Diagramms wurde die Zwick-PC Software (Version 7047.5b / 7047.17b / 7047.7b) verwendet. Datentabellen mit den Ergebnissen der Versuche wurden mit Microsoft® Excel 2002 erstellt. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit einem statistischen Softwarepaket SPSS Version 13.0 durchgeführt. Zunächst wurde zur Prüfung auf Normalverteilung ein Shapiro Wiilks Test durchgeführt. Da keine Normale Verteilung vorlag, wurde zunächst zum Gruppenvergleich der Kruskal Test durchgeführt. Bei einer vorhandenen Signifikanz wurde anschließend zum paarweisen Vergleiche der Man-Whitney-U Test angewendet. Die Ergebnisse wurde mittels Bonferoni-Holm Korrektur korrigiert. Das Signifikanz Niveau lag bei ‹ 0,05.

3. Ergebnisse

3.1 Dosisabhängige Biomechanik nach E-Beam-Sterilisation

32 tiefgefrorene BPTB–Transplantate von 8 humanen Spendern waren entsprechend der Art der E-Beam-Sterilisation randomisiert 4 Gruppen (je n=8) zugeordnet worden: **A:** nicht bestrahlt, **B:** 15 kGy E-Beam, **C:** 25 kGy E-Beam, **D:** 34 kGy E-Beam. Die Bestrahlung erfolgte unter CO_2- und Tiefkühlbedingungen (- 70 °C) und die biomechanischen Tests wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Vorkonditionierung der Präparate kamen zunächst bei allen 4 in vitro Untersuchungen 10 zyklische Belastungen von 0 bis 20 N zur Anwendung. Die anschließenden 200 zyklischen Belastungstests (20 - 200 N) wurden videooptisch aufgezeichnet und ermöglichten die Messung von Dehnung bzw. Relaxierung der Präparate. Des Weiteren erfolgte die Ermittlung der Viskoelastizität mit den Parametern Steifigkeit, Dehnung, Dehnungsdifferenz und Zyklische Elongation. Abschließend wurde die maximale Versagenskraft der der Präparate bestimmt.

3.1.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft

Die Mittelwerte von Steifigkeit und der Versagenskraft wiesen in den 4 different bestrahlten Gruppen unterschiedliche Ergebnisse auf (Tab. 4). Um native BPTB-Transplantate um 1 mm dehnen zu können, war eine Zugkraft von 239,4 ± 24,9 N erforderlich. Nach einer Bestrahlung von 15 kGy betrug die Zugkraft 230,5 ± 60,4 N, nach 25 kGy 228,1 ± 58,8 N und nach 34 kGy 217,5 ± 25,8 N. Der Abfall der Mittelwerte von 239,4 auf 217,5 N war statistisch nicht signifikant (Abb.25). In Bezug auf die maximale Versagenslast ergab sich zwischen den Gruppen 0, 15 und 25 kGy E-Beam-Bestrahlung eine, von der Dosis der Bestrahlung abhängige und abfallende Tendenz. Für native BPTB-Transplantate betrug die durchschnittliche maximale Versagenskraft 1630,5 ± 331,1 N, nach 15 kGy 1523,7 ± 374,8 und nach 25 kGy 1441,9 ± 356,8 N. Die Bestrahlung mit 34 kGy führte zu einer signifikanten Abnahme der maximalen Versagenskraft auf 1300,6 ± 229,2 ($p< 0,05$) (Abb. 26)

Tabelle 4: Steifigkeit und maximale Versagenskraft der BPTB–Transplantate (*p<0,05)

Strahlungsdosis	Steifigkeit [N/mm]	Maximale Versagenskraft [N]
0	239,4 ± 24,9	1630 ± 331,1
15	230,5 ± 60,4	1523,7 ± 374,8
25	228,1 ± 58,8	1441,9 ± 356,8
34	217,5 ± 25,8	1300,6 ± 229,2 *

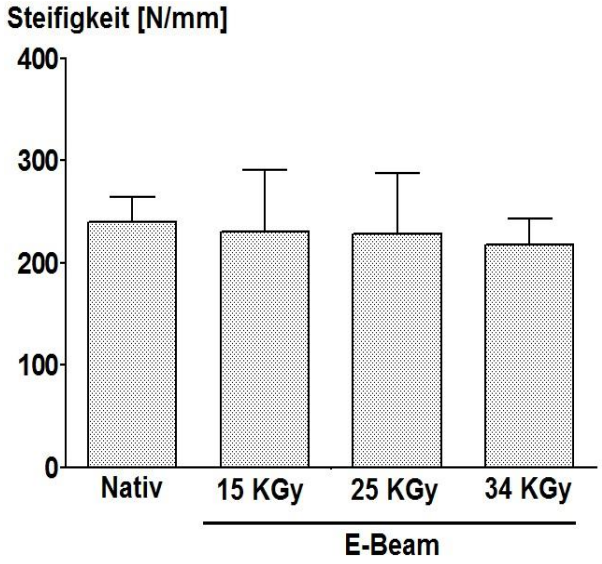


Abb. 25 Steifigkeit [N/mm]

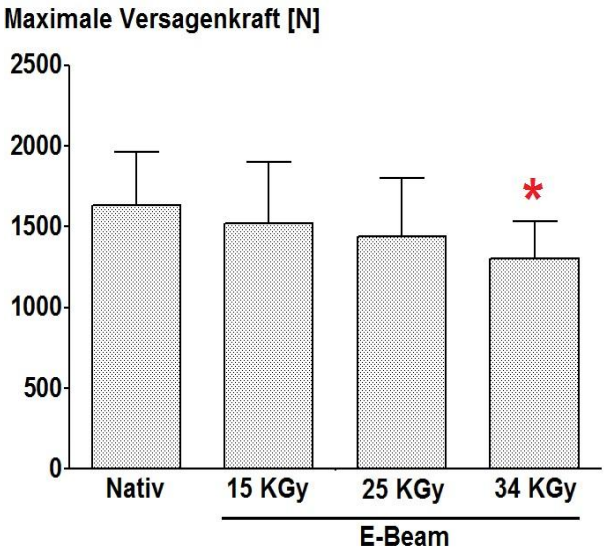


Abb. 26 Maximale Versagenskraft [N] *p<0,05

3.1.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklische Elongation

In den 200 zyklischen Belastungstests mit einer Zugkraft zwischen 20 und 200 N wiesen die nativen Kontrollpräparate eine Dehnung von 4.11 ± 1.54 % bei 20 N und von 4.47± 1.71 % bei 200 N auf (Tab. 5). Nach einer Bestrahlung von 15 kGy betrugen die Dehnungen 3,10 ± 0.85 % (L_1) und 3,25 ± 0.96 % (L_{200}). Nach Bestrahlung mit 25 und 34 kGy wiesen die Präparate eine Dehnung 4,17 ± 1,23 % (L1)/4,54 ± 1,32 % (L_{200}) bzw. 5,48 ± 3,03% (L_1)/ 5,96 ± 3,30% (L_{200}) auf. Diese Zunahme der Dehnung in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis war statistisch nicht signifikant (Abb. 27).In der Bestimmung der Dehnungsdifferenz fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbestrahlten (0,35 ± 0,34 %)

und den mit 15 kGy (0,15 ± 0,23 %), 25 kGy (0,37 ± 0,25 %) und 34 kGy (0,48 ± 0,45 %) bestrahlten BPTB–Transplantaten.

Tabelle 5: Strain und zyklische Elongation der BPTB-Transplantate

Strahlungsdosis	Strain L_{200} [%]	Strain L_1 [%]	Strain-Diff. [%]	zklyischen Elongation [mm]
0	4,47± 1,71	4,11 ± 1,54	0,35 ± 0,34	0,22 ± 0,20
15	3,25 ± 0,96	3,10 ± 0,85	0,15 ± 0,23	0,14 ± 0,12
25	4,54 ± 1,32	4,17 ± 1,23	0,37 ± 0,2	0,23 ± 0,20
34	5,96 ± 3,30	5,48 ± 3,03	0,48 ± 0,45	0,29 ± 0,27

Das Zyklische Elongation (Abb. 28) der BPTB–Transplantate ergab bei den nativen Transplantate eine irreversible Dehnung von 0,22 ± 0,20 mm, nach E-Beam-Bestrahlung mit 15 kGy 0,14 ± 0,12 mm, nach 25 kGy 0,23 ± 0,20 mm und nach 34 kGy 0,29 ± 027 mm. Diese Differenzen waren statistisch nicht signifikant (Tab. 5).

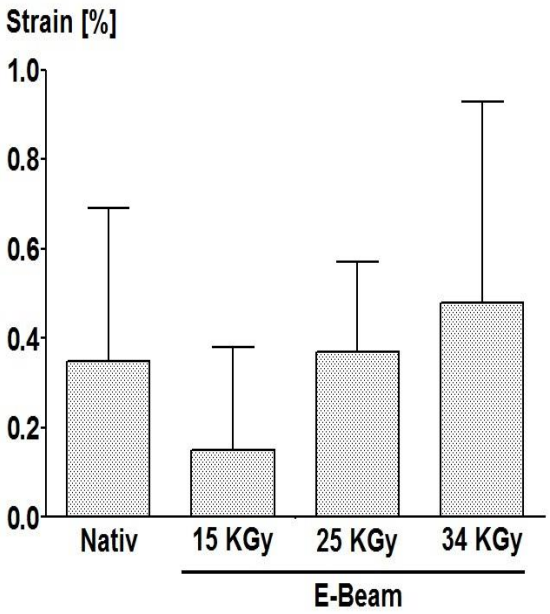


Abb. 27 Strain [%]

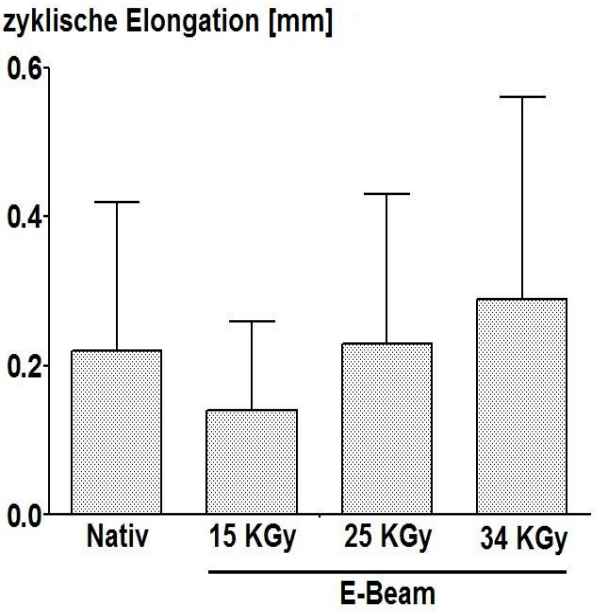


Abb. 28 Zyklische Elongation [mm]

3.2 E-Beam- vs. Gammabestrahlung (15-25 kGy)

40 BPTB-Transplantate von 10 humanen Spendern waren entsprechend der Art der E-Beam-Sterilisation randomisiert 4 Gruppen (je n = 10) zugeordnet worden: **A:** nicht bestrahlt, **B:** 15 kGy E-Beam, **C:** 25 kGy E-Beam, **D:** 25 kGy Gammasterilisation. Die Bestrahlung erfolgte an konservierten Präparaten bei CO_2 und Tiefkühlung auf -70°C. Die biomechanischen Tests wurden bei Raumtemperatur vorgenommen

3.2.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft

Die Ergebnisse der Bestimmungen von Steifigkeit und Versagenskraft der 4 different bestrahlten Gruppen sind in Tab. 6 zusammen gefasst. Die Steifigkeit der nativen BPTB–Transplantate betrug 182,1 ± 53,0 N/mm. Die mit 15 kGy E-Beam bestrahlten Sehnen wiesen eine Steifigkeit von 147,8 ± 46,8 N/mm auf und nach Bestrahlung mit 25 kGy betrug die Steifigkeit der Präparate 152,0 ± 37,0 N/mm. Nach einer Gammabestrahlung mit 25 kGy betrug die Steifigkeit 126,1 ± 45,4 N/mm (Abb. 29). Die maximale Versagenskraft der nativen BPTB–Transplantate betrug 1609 ± 562 N. Nach E-Beam-Bestrahlung mit 15 kGy und 25 kGy ergaben sich mit 1175 ± 628 bzw. 1177 ± 512 N nahezu identische Werte. Der Unterschied der maximalen Versagenskraft war gegenüber den nicht bestrahlten Präparaten, statistisch nicht signifikant.

Tabelle 6: Steifigkeit und maximale Versagenskraft der BPTB-Transplantate (*p 0,05) *E-Beam, $^{+}$Gamma

Strahlungsdosis	Steifigkeit [N/mm]	Maximale Versagenkraft [N]
0	182,1 ± 53,0	1609 ± 562
15 *	147,8 ± 46,8	1175 ± 628
25 *	152 ± 37,	1177 ± 512
25 $^{+}$	126,1 ± 45,4	1009 ± 400 *

Ein signifikanter Unterschied ($p< 0,05$) bestand in der Analyse der maximalen Versagenskraft zwischen nativen und Gamma bestrahlten BPTB–Transplantaten (Tab.6/ Abb. 30). Gegenüber den Bestimmungen der Steifigkeit von nativen und mit E-Beam bestrahlten BPTB–Transplantaten (15 kGy und 25 kGy) der Versuchsgruppe 1 (Tab.1) gab es deutliche intergruppale Differenzen. Auf diese wird in der Diskussion eingegangen.

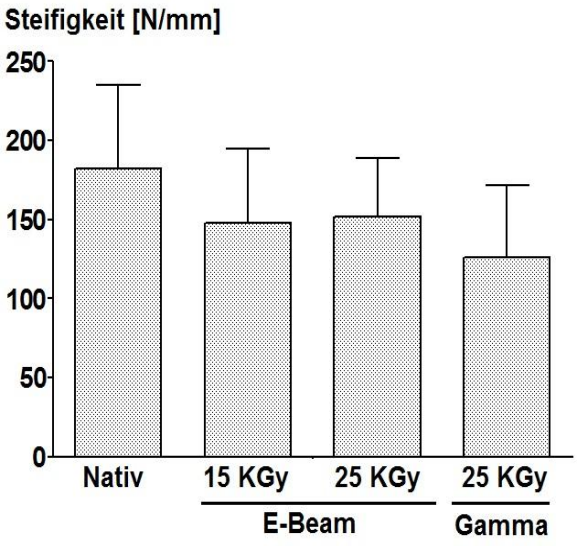


Abb. 29 Steifigkeit [N/mm]

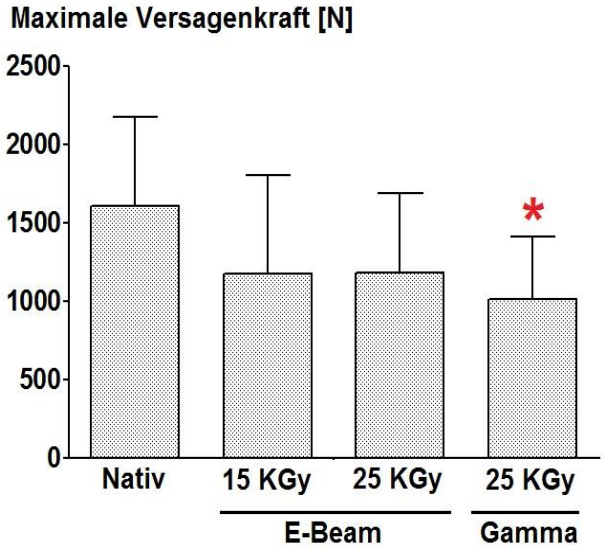


Abb. 30 Maximale Versagenskraft [N]

3.2.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklische Elongation

In den 200 zyklischen Belastungstests mit einer Zugkraft zwischen 20 und 200 N wiesen die nativen Kontrollpräparate eine Dehnung von 5,00 ± 2,99 % bei 20 N (L_1) und 5,82 ± 3,56% bei L_{200} auf (Tab.7). Nach E-Beam Bestrahlung mit 15 kGy waren die Dehnungen mit 3,99 ± 1,82 % (L_1) und 5,08 ± 2,38 % (L_{200}) gegenüber den nativen Kontrollen statistisch nicht signifikant. Nach 25 kGy E-Beam-Bestrahlung traten Dehnungen von 6,29 ± 3,92 (L_1) und 7,0 ± 4,11 % (L_{200}) und nach 25 kGy Gammabestrahlung von 4,80 ± 1,15 % (L_1) und 6,17 ± 2,09 % (L_{200}) auf. Die Dehnungs-Unterschiede zwischen den 4 Gruppen waren statistisch nicht signifikant (Abb. 31).

Tabelle 7: Strain und zyklischen Elongation der BPTB-Transplantate

Strahlungsdosis	Strain L_{200} [%]	Strain L_1 [%]	Strain-Diff. [%]	zklyischen Elongation [mm]
0	5,82± 3,56	5,00 ± 2,99	0,80 ± 0,68	0,53 ± 0,46
15* E-Beam	5,08 ± 2,32	3,99 ± 1,82	1,09 ± 1,16	0,69 ± 0,82
25* E-Beam	7,00 ± 4,11	6,29 ± 3,92	0,73 ± 0,50	0,23 ± 0,20
25+ Gamma	6,17 ± 2,09	4,80 ± 1,15	1,35 ± 2,04	0,96± 1,34

Das zyklischen Elongation der BPTB–Transplantate ergab bei den nativen Präparaten eine irreversible Dehnung von 0,53 ± 0,46 mm, nach E-Beam-Bestrahlung mit 15 kGy von 0,69 ± 0,82 mm und mit 25 kGy E-Beam 0,50 ± 0,34 mm (Tab. 7). Die Mittelwerte im zklyischen Elongation stiegen nach einer Gammabestrahlung von 25 kGy auf 0,96 ± 1,34 mm an, waren auf Grund der hohen Streubreite nicht signifikant erhöht (Abb. 32).

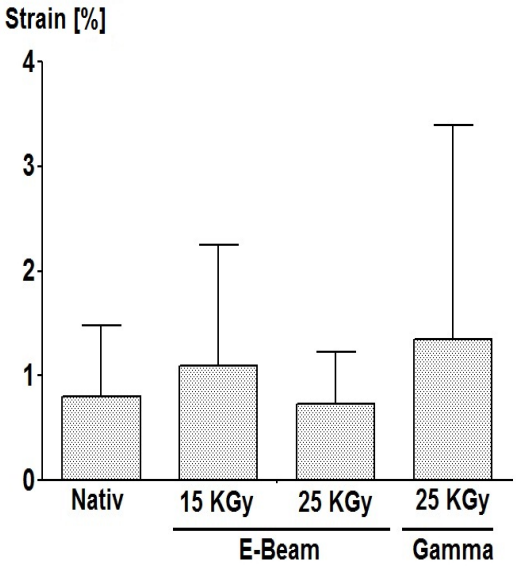


Abb.31 Strain [%]

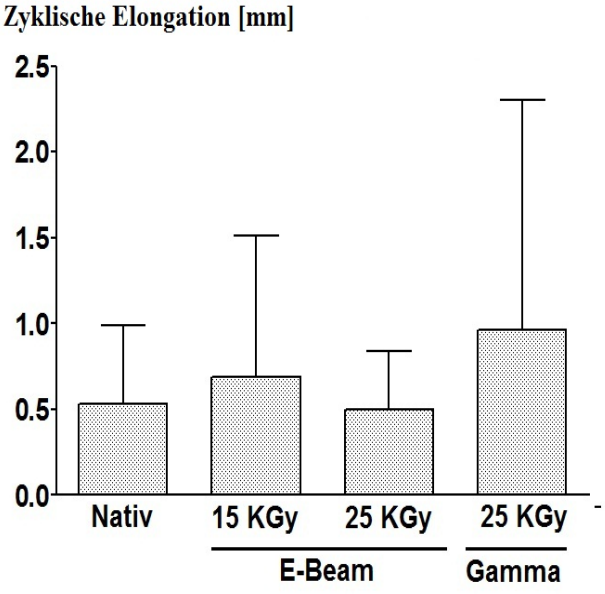


Abb.32 Zyklische Elongation [mm]

3.3 E-Beam- (34 kGy) vs. Gammabestrahlung (34 kGy)

Ausgehend von der in Deutschland empfohlenen Hochdosisbestrahlung von > 30 kGy zur Sterilisation allogener Gewebepräparate wurden 30 tiefgefrorene BPTB-Transplantate von 10 humanen Spendern nach dem Randomschema entsprechend der Art der Sterilisation 3 Gruppen (je n = 10) zugeordnet: **A:** nicht bestrahlt, **B:** 34 kGy E-Beam, **C:** 34 kGy Gamma-Sterilisation. Die Bestrahlung der Präparate erfolgte unter Konservierungsbedingungen mit CO_2 und Tiefkühlung auf -70°C. Die biomechanischen Tests wurden bei Raumtemperatur vorgenommen.

3.3.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft

In der Bestimmung der Steifigkeit der BPTB-Transplantate zeigten die nativen Sehnen mit 199,6 ± 59,1 N/mm und mit 34 kGy E-Beam bestrahlten Sehnen mit 192,8 ± 58,0 N/mm nahezu identische Ergebnisse. Nach 34 kGy Gammabestrahlung betrug die Steifigkeit der Sehnen 170,6 ± 58,2 N/mm (Tab.8). Diese Reduktion der Sehnensteifigkeit nach Gammabestrahlung war gegenüber den bei nativen und E-Beam bestrahlten Sehnen statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 33). Sowohl nach E-Beam-Sterilisation als auch nach Gammabestrahlung in einer Dosis von 34 kGy kam es mit 1139 ± 445 N bzw. 1073 ± 617 N zu einem signifikanten Abfall der bei nativen Sehnen gemessenen Versagenskraft gegenüber 1741 ± 304 N (Abb. 34).

Tabelle 8: Steifigkeit und maximale Versagenskraft BPTB-Transplantate (*p<0,05)*E-Beam und +Gamma

Strahlungsdosis	Steifigkeit [N/mm]	Maximale Versagenskraft [N]
0	199,6 ± 59,1	1741 ± 304
34 +	170,6 ± 58,2 *	1073 ± 617 *
34 *	192,8 ± 58,0	1139 ± 445 *

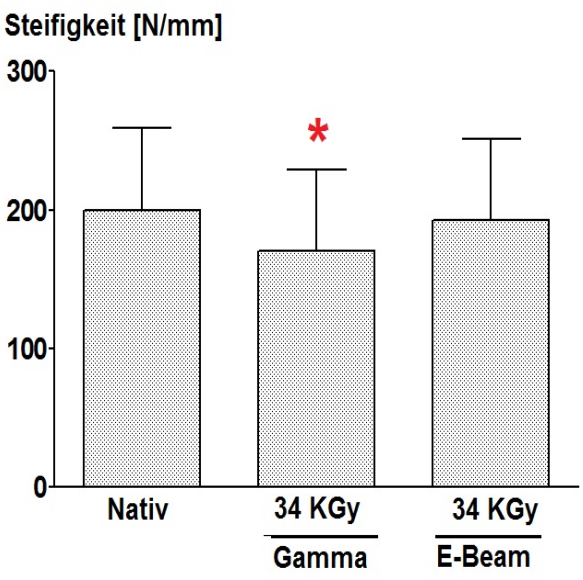


Abb. 33 Steifigkeit [N/mm]

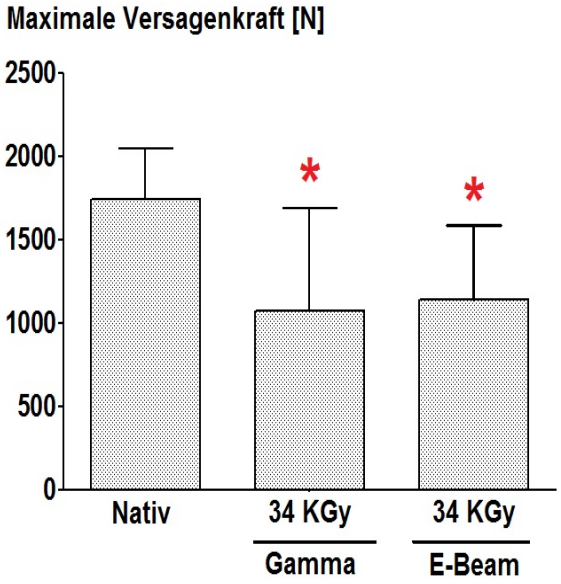


Abb. 34 Maximale Versagenskraft [N]

3.3.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklische Elongation

Die Dehnung der nativen Sehnenpräparate betrug vor den zyklischen Belastungstests L_1 3,0 ± 2,8 % und bei L_{200} 3,3 ± 2,7 %. Das entsprach einer belastungsabhängigen Dehnungsdifferenz von 0,3 ± 0,3 %. Die mit 34 kGy Gamma bestrahlten Präparate wiesen vor Belastung eine Dehnung von 4,4 ± 3,0 % und die mit 34 kGy E-Beam bestrahlten Sehnen von 4,1 ± 1,7 % auf. Nach Beendigung der zyklischen Belastung (L_{200}) betrug die Dehnung in der Gamma–Gruppe 5,5 ± 3,8 % und in der E-Beamgruppe 4,6 ± 1,8 % (Tab. 9).Im Gegensatz zur Hochdosis-E-Beam-Bestrahlung waren das Dehnungs- und Zyklische Elongation von Sehnenpräparaten nach Gammabestrahlung mit 34 kGy signifikant, gegenüber den nativen Sehnenpräparaten, geschädigt (Abb. 35/36).

Tabelle 9: Strain und zyklische Elongation BPTB-Transplantate (*p<0,05) *E-Beam und $^{+}$Gamma

Strahlungsdosis	Strain L_{200} [%]	Strain L_1 [%]	Strain-Diff. [%]	zyklischen Elongation [mm]
0	3,3 ± 2,7	3,0 ± 2,8	0,3 ± 0,3	0,19 ± 0,18
34 $^{+}$	5,5 ± 3,8	4,4 ± 3,0	1,1 ± 1,1 *	0,71 ± 0,70 *
34 *	4,6 ± 1,8	4,1 ± 1,7	0,4 ± 0,4	0,29 ± 0,28

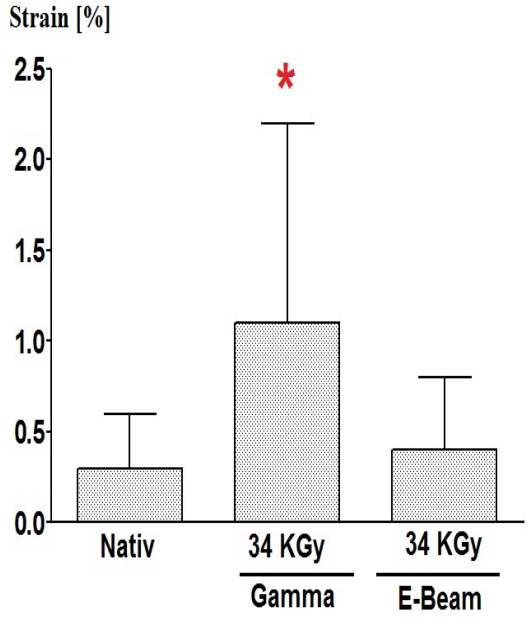


Abb.35 Strain [%]

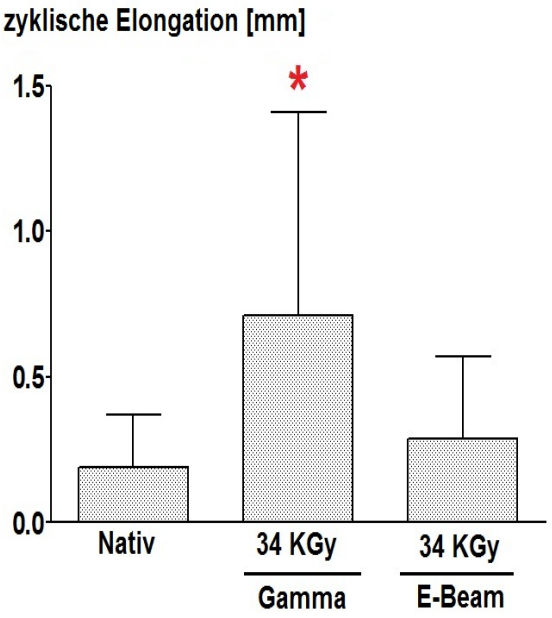


Abb.36 Zyklische Elongation [mm]

3.4 Fraktionierte E-Beam-Sterilisation

In den bisherigen in vitro Studien wurde eine geringere Schädigung der biomechanischen Eigenschaften nach E-Beam-Bestrahlung im Vergleich zur Gammabestrahlung gefunden. Allerdings fanden sich signifikante Schädigungen der Versagenskraft nach E-Beam Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 34 kGy. Daher wurde im folgenden Versuch der Einfluss einer fraktionierten E-Beam-Bestrahlung (34 kGy) auf die biomechanischen Eigenschaften von Sehnengewebe untersucht. 44 BPTB-Transplantate von 11 humanen Spendern wurden randomisiert 4 Untersuchungsgruppen (je n = 11) zugeordnet: **A -** native humane BPTB – Präparate (n = 11), **B –** 34 kGy Gammasterilisation als Einmaldosis (n = 11), **C -** 34 kGy E-Beam-Sterilisation als Einmaldosis (n = 11) und fraktionierte (gestaffelte) 10-mal 3,4 kGy E-Beam-Sterilisation (n = 11). Die Sterilisation erfolgte an tiefgefrorenen Präparaten (70 ^{o}C und CO_2) und die biomechanischen Tests bei Raumtemperatur.

3.4.1 Steifigkeit und maximale Versagenskraft

Die Steifigkeit zwischen nativen und fraktioniert mit E-Beam bestrahlten Präparaten war identisch. Native Sehnen hatten eine Steifigkeit von 239 ± 92 N/mm und fraktioniert mit E-Beam sterilisierte 254± 111 N/mm (Tab.10). Die Steifigkeit der mit 34 kGy Einzeldosen (E-

Beam-, Gammasterilisation) bestrahlten Sehnen betrug 216 ± 63 bzw. 178 ± 48 N/mm. Diese Verminderung der Steifigkeit war gegenüber nativen und fraktioniert bestrahlten Sehnen nicht signifikant (Abb. 37). Die fraktioniert E-Beam-Sterilisation hatte keinen signifikanten Einfluss auf die maximale Versagenskraft von nativen und fraktioniert, mit E-Beam bestrahlten Sehnenpräparaten (Tab. 10). Native Sehnen wiesen eine maximale Versagenskraft von 1499 ± 352 N und fraktioniert bestrahlte von 1327 ± 305 auf (Abb. 38). Nach Einzeldosen von 34 kGy betrug die maximale Versagenskraft in der E-Beam-Gruppe 1024 ± 204 N in der Gruppe mit Gammabestrahlung 827 ± 209 N. Die maximale Versagenskraft war in der Gruppe mit Gammabestrahlung signifikant niedriger als in der Einzeldosis der E-Beam-Bestrahlung Gruppe (p = 0,046). Signifikant niedriger war die maximale Versagenskraft auch nach Gamma- und Einzeldosis E-Beam-Bestrahlung gegenüber der fraktionierten E-Beam-Bestrahlung (p = 0,001, p = 0,008) und der nicht bestrahlten Kontrollgruppe (p = 0,001, p = 0,002). Die BPTB-Transplantate zeigten bei Fraktionierung einer 34 kGy E-Beam-Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede gegenüber den nicht bestrahlten Kontrollen (p = 0,270).

Tabelle 10: Steifigkeit und maximale Versagenskraft der BPTB-Transplantate (+ *p< 0,05) (#fraktioniert, *Einzeldosis, +Gamma)

Strahlungsdosis	Steifigkeit [N/mm]	Maximale Versagenkraft [N]
0	239 ± 92	1499 ± 352 + *
34 #	254 ± 111	1327± 305 + *
34 *	216± 63	1024± 204 +
34 +	178 ± 48	827 ± 209

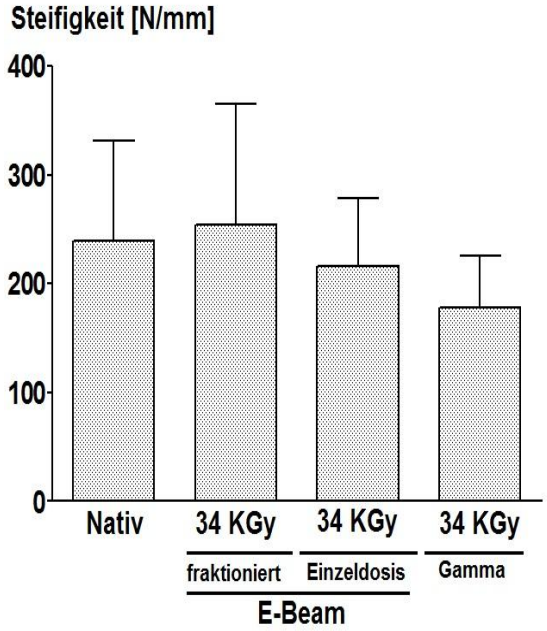


Abb. 37 Steifigkeit [N/mm]

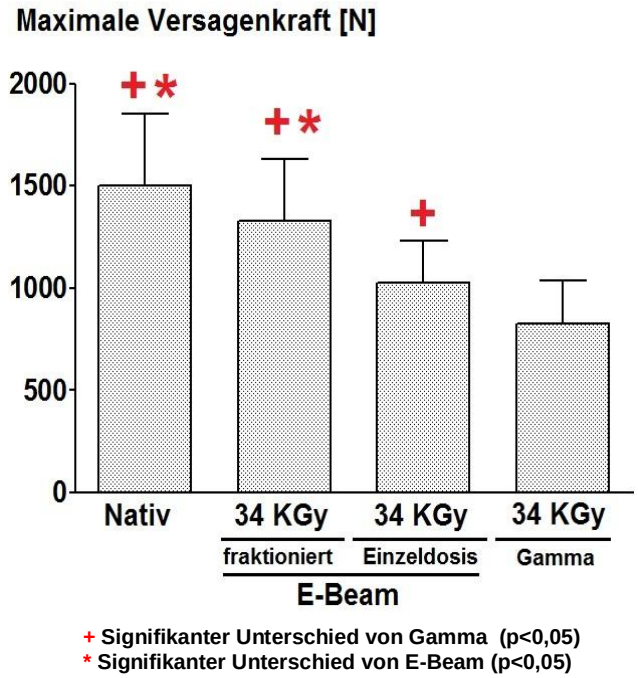


Abb. 38 Maximale Versagenskraft [N]

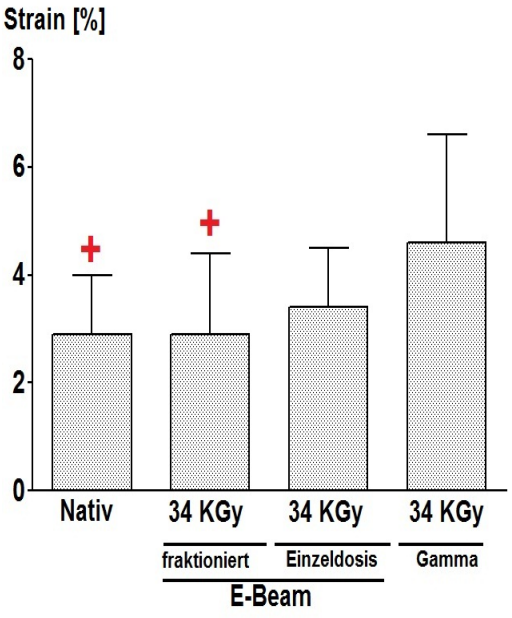
3.4.2 Dehnung, Dehnungsdifferenz und zyklischen Elongation

Während der 200 zyklischen Belastungen von L_1 (20 N) bis L_{200} (200 N) wies die nicht bestrahlte Kontrollgruppe einen Strain von 2,9 ± 1,1 % und die mit einer fraktionierten E-Beam Bestrahlung (34 kGy) behandelten Sehnen einen Strain von 2,9 ± 1,5 % auf. Diese Ergebnisse waren nahezu identisch (Tab. 11). Demgegenüber war der belastungsabhängige Strain nach E-Beam-Bestrahlung 34 kGy Einzeldosis mit 3,4 ± 1,1 % und Einzeldosis Gammabestrahlung mit 4,6 ± 2,0 % signifikant erhöht (Abb. 39). Die Signifikanzen der mit fraktionierter E-Beam-Dosierung bestrahlten und nicht bestrahlten Präparate im Vergleich zu der Gammagruppe betrugen p = 0,008 und p = 0,002. Keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen den Gruppen Einzeldosis-Gamma- und E-Beam-Bestrahlung (p =0,890) sowie E-Beam-Fraktionierung und nicht bestrahlter Kontrollgruppe (p = 0,401) Diese Analyse der zyklischen Elongation zeigte ähnliche Ergebnisse (Tabelle 11) mit signifikanten Unterschieden zwischen Gamma- zu fraktionierter Bestrahlung und im Vergleich mit E-Beam bestrahlten Präparaten (p=0,05). Keine statistisch signifikanten Unterschiede wurden in der Messung der zyklischen Elongation zwischen Einzeldosis E-Beam- und fraktionierter E-Beam Bestrahlung (p = 0,076) gefunden. Nicht bestrahlte Kontrollen wiesen eine signifikant

geringere zyklischen Elongation gegenüber Gamma- (p = 0,002) und Einzeldosis E-Beam Proben auf (p=0,004). Es wurden erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen E-Beam-Fraktionierung und der nicht bestrahlten Kontrollgruppe (p = 0,332) gefunden (Abb. 40).

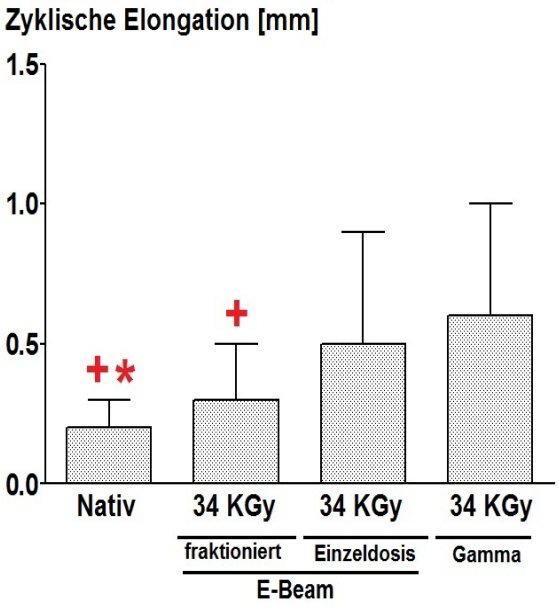
Tabelle 11: Strain und zyklischen Elongation der BPTB-Transplantate (*p<0,05)
(#fraktioniert, *Einzeldosis, +Gamma)

Strahlungsdosis	Strain [%]	zyklischen Elongation [mm]
0	2,9 ± 1,1 +	0,2 ± 0,1 + *
34 #	2,9 ± 1,5	0,3 ± 0,2
34 *	3,4 ± 1,1 +	0,5 ± 0,4 +
34 +	178 ± 48	0,6 ± 0,4



+signifikanter Unterschied zu Gamma (p<0,05)
* signifikanter Unterschied zu E-Beam-Einzeldosis (p<0,05)

Abb. 39 Strain [%]



+signifikanter Unterschied zu Gamma (p<0,05)
* signifikanter Unterschied zu E-Beam-Einzeldosis (p<0,05

Abb. 40 Zyklische Elongation [mm]

3.5 Tierexperimentelle Ergebnisse

3.5.1 E-Beam-Allograft nach 6 Wochen

Die maximale Versagenskraft (67,20 N) und die Steifigkeit (16,75) der mit E-Beam bestrahlten Transplantate waren 6 Wochen nach Transplantation gegenüber den nicht bestrahlten Kontroll-, Allograft- und Autograft-Gruppen signifikant reduziert (Tab.12/Abb. 41,42). Die maximale AP- Laxizität (Mittelwert: 3,76 mm) der mit E-Beam bestrahlten Allografts zeigte beim Versagenstest im Vergleich zu den Kontrollgruppen und zur Allograft-Gruppe ebenfalls eine signifikante Reduktion (Tabelle 12/ Abb.43).

Tabelle 12: Biomechanische Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 6 Wochen

Variable	E-Beam	Allografts	Autografts	VKB nativ
Steifigkeit [N/mm]	16,75	69,05	61,75	161,89
Versagenskraft [N]	67,6	180,96	222,4	1611,52
AP- Laxizität [mm]	3,76 *	4,90	4,30 *	9,38

Drei E-Beam behandelte Transplantate rissen bereits intraligamentär vor dem eigentlichen Versagenstest, so dass keine maximale Versagenskraft gemessen werden konnte. Die restlichen Transplantate wurden beim Versagenstest in vier Fällen aus dem Knochentunnel gezogen, ein Transplantat versagte intraligamentär.

3.5.2 E-Beam-Allograft nach 12 Wochen

Die maximale Versagenskraft (Mittelwert: 62,88 N) und maximale Steifigkeit (12,10 N/mm) der mit E-Beam bestrahlten Transplantate (Tab. 13/ Abb.41, 42) zeigten nach 12 Wochen gegenüber den Kontrollgruppen einen signifikanten Unterschiede. Die maximale AP-Laxizität (Mittelwert: 8,60 mm) zeigt gegenüber der nativen Gruppen (Mittelwert: 9,38 mm) keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 13/ Abb.43). Nach 12 Wochen rupturierten die E-Beam-Allografts intraligamentär. Davon versagten 3 Transplantate breites im Rahmen des Vorderen Kreuzbandtests, so dass keine maximale Versagenskraft gemessen werden konnte.

Tabelle 13: Biomechanische Eigenschaften der VKB-Transplantate nach 12 Wochen

Variable	E-Beam	Allografts	Autografts	VKB nativ
Steifigkeit [N/mm]	12,10	67,10	74,59	161,89
Versagenkraft [N]	62.88	291,20	374,72	1611,72
AP- Laxizität [mm]	8,60	4,80	5,95	9,38

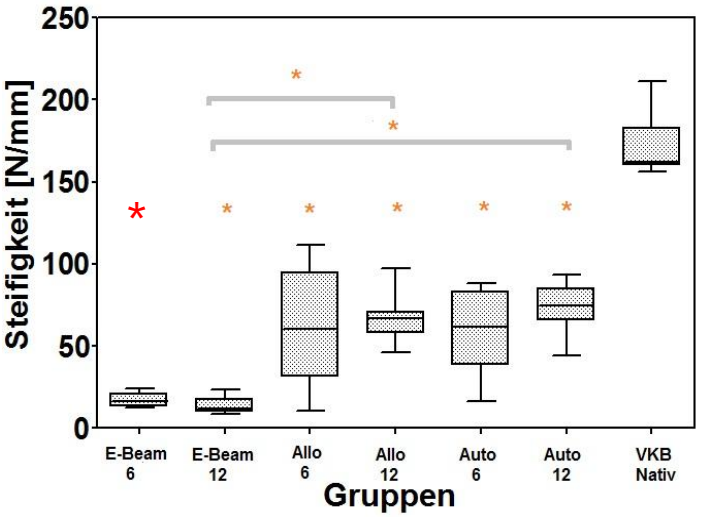


Abbildung 41: Vergleich Steifigkeit nach E-Beam, Allograft, Autograft u. nativ auf 6 und 12 Wochen, $p<0,05$

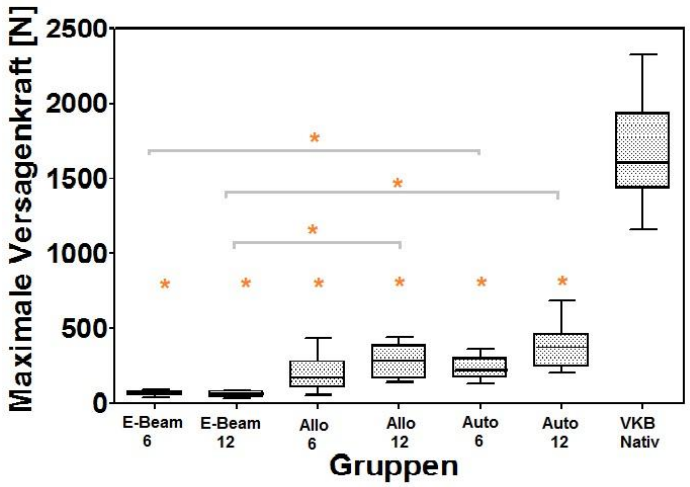


Abbildung 42: Vergleich der maximalen Versagenskraft nach E-Beam, Allograft (unbestrahlt), Autograft (unbestrahlt) und native Kontrolle auf 6 und 12 Wochen, $p<0,05$

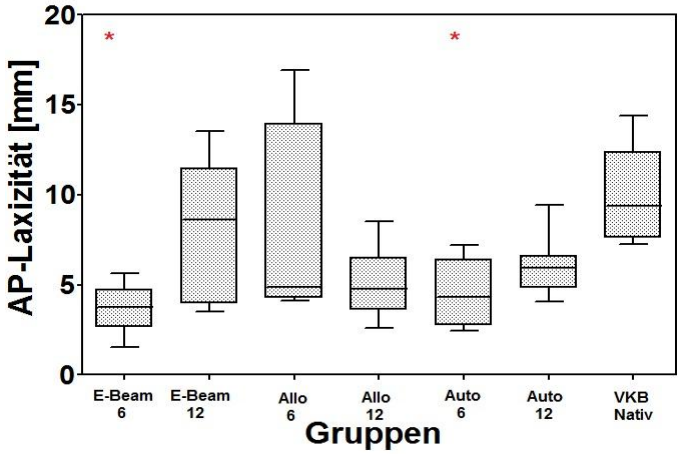


Abbildung 43: Vergleich der AP-Laxizität nach E-Beam, Allograft (unbestrahlt), Autograft (unbestrahlt) und native Kontrolle auf 6 und 12 Wochen, *p<0,05

4. Diskussion

4.1 Allogene Sehnentransplantate

Mit ca. 50.000 Rupturen des VKB pro Jahr in Deutschland besitzt diese Verletzungsart eine hohe klinische Relevanz (Wilcke, 2004). Für Orthopäden und Unfallchirurgen stellt der operative Ersatz des rupturierten VKB weltweit die Standardtherapie dar. Autologe Sehnen mit beidseitigen ossären Fixationsblöcken (BPTB) und Sehnen ohne ossäre Anteile (STG) werden gegenwärtig bevorzugt für Ersatzplastiken eingesetzt (Petersen und Zantop, 2009). Hauptnachteile dieser Transplantate sind die mit der Entnahme verbundene Morbidität und die sich hieraus ergebenden kurz- und langfristigen Funktionsstörungen.

In den letzten 30 Jahren wurden daher verstärkt Versuche unternommen, allogenes Gewebe für die Therapie der VKB – Ruptur einzusetzen. Eine absolute Indikation für den allogenen Ersatz kann es bei multiligamentären Kniegelenksverletzungen und bei wiederholter Ruptur des VKB geben, da autologes Sehnengewebe nicht mehr ausreichend zur Verfügung steht. Die Bereitstellung allogener Gewebetransplantate erfordert einen hohen pharmazeutischen, logistischen und finanziellen Aufwand hinsichtlich der Entnahme, der Konservierung und der Sterilisation der allogenen Gewebetransplantate. Des Weiteren ist die Möglichkeit einer immunologisch bedingten Abstoßungsreaktion gegeben, die bei bradytrophem Gewebe jedoch selten auftritt und durch Tieffrieren deutlich reduziert werden kann. Anfänglich wurden Allografts ausschließlich in der Revisionschirurgie des VKB angewendet. In den letzten Jahren ist die Indikation zunehmend in den Bereich des primären Kreuzbandersatz erweitert wurden aufgrund der positiven klinischen Ergebnisse nach Revisionseingriffen (Vangsness, 2006).

Der Einsatz allogenen Spendergewebes in der vorderen Kreuzbandchirurgie weist gravierende regionale Unterschiede weltweit auf. Hierfür gibt es verschiedene Ursachen. Zum einen existieren sehr unterschiedliche Anforderungen an die klinische Eignung des Spenders sowie erhebliche Unterschiede in den rechtlichen Vorgaben der Länder, z.B. bei der Zustimmungsfrage. In den USA besteht eine hohe Spenderbereitschaft und, eine große Anzahl von Gewebebanken gestattet die erforderliche Aufarbeitung und Abgabe von Spendergewebe. Gute klinische Resultate führten zu einem sprunghaften Anstieg der Nutzung

von muskulo-skeletalen Allografts. Zwischen 1990 und 2001 konnte ein Anstieg von 350.000 auf 875.000 operativ verwendeter Allografts von Sehnen- und Knochengewebe beobachtet werden (Guelich et al., 2007). Ca. 10% dieser Allografts wurden für den Kreuzbandersatz verwendet (Surez et al., 2007). Nach einer Umfrage der AOSSM aus dem Jahr 2006 befürworteten 86% von 365 befragten Orthopäden der USA den Einsatz von Allografts in der Kreuzbandchirurgie (McAllister et al., 2007).

Im Gegensatz zum US–amerikanischen Raum werden in Deutschland für den Ersatz des rupturierten VKB wesentlich seltener allogene BPTB- bzw. Sehnen-Transplantate verwendet. Ursächlich hierfür sind die geringe Zahl von Gewebebanken sowie .rechtliche Beschränkungen, denen die Entnahme, Aufbereitung, Konservierung und Transplantation von humanem Spendersehnen, wie sie in der Kreuzbandchirurgie Anwendung finden, unterliegen (Hübner et al., 2009). Hauptursache für den geringen Einsatz von allogenen Sehnentransplantaten stellt die mit der Transplantation verbundene mögliche Übertragung von Infektionserregern vom Spender auf den Empfänger dar. Einer Umfrage der AGA zufolge würden 66% der Orthopäden und Unfallchirurgen in Deutschland Allografts für den Ersatz des VKB verwenden, wenn diese in der erforderlichen Qualität bezüglich der Sterilität und biomechanischen Eigen-schaften zur Verfügung stünden (Mayr et al., 2007). In Deutschland finden aktuell Inaktivierungsverfahren wie z.B. PES-Sterilisation bzw. Hochdosis Gammabestrahlung Anwendung, um eine Erregerübertragung sicher ausschließen zu können. Jedoch führen sämtliche aktuell zur Verfügung stehende Verfahren zu einer gravierenden Schwächung der biomechanischen Eigenschaften von Allografts (Scheffler et al., 2010).

Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass es bei Sterilisation mit Gammabestrahlung in Dosierungen von 10 bis 50 kGy eine Dosis-abhängige negative Beeinflussung biomechanischer Eigenschaften von allogenen Sehnentransplantaten gibt (Gibbons et al., 1991; Anderson et al., 1992; Rasmussen et al., 1994; Salehpour et al., 1995; Fideler et al., 1995; Currey et al.,1997; Yusof, 2000), so dass die derart behandelten Transplantate nicht oder nur sehr eingeschränkt verwendet werden. Da keine vergleichbaren Untersuchungsergebnisse über die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit der E-Beam-Sterilisation an BPTB–Transplantaten in der Literatur beschrieben sind, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit erstmals den Einfluss des E-Beam Bestrahlungsverfahrens auf die biomechanischen

Eigenschaften von Sehnentransplantaten zunächst in vitro und anschließend im Tiermodell zu untersuchen.

4.2 Bestrahlung von Sehnengewebe

4.2.1 Gammabestrahlung

Weltweit ist die Gamma Sterilisation das am weitesten verbreitete und am häufigsten angewendete Sterilisationsverfahren für allogene Sehnentransplantate zur Rekonstruktion des VKB. Gammastrahlen, die beim Zerfall des radioaktiven Elements ^{60}Cobalt entstehen, greifen mit der Bildung von freien Radikalen gravierend und zerstörend in die Replikation von Mikroorganismen ein. Bei der Bestrahlung werden Niedrigdosis- ($\leq$ 15 kGy) von Hochdosis- ($\geq$ 30 kGy) Verfahren unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Niedrigdosisbestrahlung ausreichend ist, um einen vollständigen Schutz vor der Übertragung von bakteriellen Erregern durch Weichteiltransplantate zu gewährleisten (Halls, 1992). Dagegen kann ein adäquater Schutz vor Übertragung von Viren nur bei deutlich höheren Strahlendosen ($\geq$ 30 kGy) erreicht werden (Campbell und Li, 1999, Pruss et al., 2002), die in aller Regel mit erheblichen biologischen Einschränkungen der Gewebe verbunden sind. So konnte in verschiedenen in vitro Studien nachgewiesen werden, dass bereits Strahlendosen >20 kGy zu einer deutlichen Reduktion der biomechanischen Eigenschaften von Weichteiltransplantaten, die in der VKB-Chirurgie Anwendung finden, führten (Fideler et al., 1995; Rasmussen et al., 1994). Gleichzeitig wurde in klinischen Studien eine deutlich erhöhte Versagerrate von VKB Rekonstruktionen nach Gamma-Hochdosis Bestrahlung beobachtet (Rappe et al., 2007; Sun et al., 2009). Diese Ergebnisse haben dazu geführt, dass mit einer Dosierung von $\geq$ 30 kGy inaktivierte Sehnentransplantate im Bereich der VKB–Chirurgie derzeit keine Anwendung findet.

4.2.2 E-Beam-Bestrahlung

Als Alternative zur Gammastrahlung existiert mit E-Beam ein weiteres Bestrahlungsverfahren, bei dem hochenergetische Elektronenstrahlen zur Sehnensterilisation genutzt werden können. Der technische Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Gammastrahlung besteht darin, dass eine höhere Energie pro Zeit appliziert werden kann und die Dichte der Bestrahlung pro Fläche deutlich homogener ausfällt. Damit kann die Dauer der Bestrahlung auf Minuten reduziert werden und es werden Dosisspitzen vermieden, die bei Gammabestrahlung unvermeidbar sind. Daraus resultierte die Hypothese, dass nach E-Beam

Bestrahlung eine deutlich geringere Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften eintritt, als die Gammabestrahlung.

4.3 Gamma- vs. E-Beam-Bestrahlung von Sehnenallografts

In den hier vorgelegten in vitro Untersuchungen wurde der Einfluss von unterschiedlich dosierten Gamma- und E-Beam Bestrahlungen in 4 Testserien auf die biomechanischen Eigenschaften humaner BPTB–Sehnentransplantate überprüft. Primär sollte untersucht werden, ob das E-Beam-Verfahren biomechanische Vorteile gegenüber der Standard-Gammabehandlung aufweist. Nach einer Dosis-Wirkungsstudie bei 15, 25 und 34 kGy zu E-Beam, die deren Eignung auch für hohe Strahlendosen zeigen sollte (34 kGy), schloss sich ein Vergleich von E-beam und Gamma bei 25 und 34 kGy als effizienter Einzeldosis an. Schließlich wurde geprüft, ob eine fraktionierte E-Beam-Hochdosisbestrahlung mit 34 kGy Vorteile im Vergleich zur herkömmlichen Gammabestrahlung bietet. Die Konstellation 34kGy E-Beam wurde zusätzlich im Schafsmodell getestet. Bei den vier in vitro Testserien handelte es ich im Einzelnen um:

- E-Beam-Sterilisation 15, 25 und 34 kGy
- E-Beam- und Gamma-Sterilisation 25 kGy
- E-Beam- und Gamma-Sterilisation 34 kGy
- Fraktionierte E-Beam-Sterilisation (34 kGy) versus E-Beam- und Gamma-Einzeldosis (34 kGy)

4.3.1 E-Beam-Sterilisation 15, 25 und 34 kGy

Die dosisabhängige Beeinflussung von humanen BPTB–Transplantaten war hinsichtlich der verschiedenen biomechanischen Parameter nach E-Beam-Sterilisation unterschiedlich. Während Steifigkeit, Dehnung, Dehnungsdifferenz und Zyklische Elongation gegenüber nativen Sehnen nach Dosen von 15, 25 und 34 kGy nahezu identisch waren, traf das bezüglich der maximalen Versagenskraft nur auf die Dosierungen von 15 und 25 kGy zu. 34 kGy E-Beam-Sterilisation führte zu einer signifikant verminderten maximalen Versagenskraft ($p = 0,36$; Bonferroni-Test). Seto et al. untersuchten den Einfluss einer 50 kGy Gamma und E-Beam Hoch-dosisbestrahlung auf Kaninchen Achillessehnen unter verschiedenen protektiven Konditionierungen (Ethyl-Dimethyl- aminopropyl-Carbodiimid – EDC; Scavengers wie Mannitol, Ascorbinsäure, Riboflavin) in vitro (Seto et al., 2008). Sie fanden eine minimale Beeinträchtigung von Steifigkeit, Dehnungs- und Zyklische Elongation, jedoch

keine signifikante Verminderung der maximalen Versagenslast. Während *Seto et al.* Radikalfänger, wie Mannitol, Riboflavin und Askorbinsäure einsetzten und eine Bestrahlungsdosis von 50 kGy benutzten, fand der Sterilisationsprozess in unserer Studie in Gegenwart von CO_2 und bei maximal 34 kGy statt. Dabei scheint die protektive Wirkung der von Seto eingesetzten Radikalfänger grösser zu sein als die alleinige Zugabe von CO_2 zum Sauerstoffausschluss in unserem Versuch.

Die wesentliche Ursache der schädigenden Wirkung von ionisierenden Strahlen liegt in der Radiolyse von Wasser (Sauer, 2002). In diesem Prozess entstehen neben Ionen (H^+, O^-, H_2O^+, e^-) auch Radikale (H, OH) und Peroxide (H_2O_2). Die Bildung der zellschädigenden Radikale ist bei sauerstoffhaltiger Umgebung von bestrahltem biologischem Material quantitativ erhöht. Daher konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Sterilisation mit Elektronenstrahlen unter Zusatz von CO_2 als Radikalenfänger eine verbesserte Alternative zur etablierten Gammabestrahlung darstellte. Die Wirkung von CO_2 basiert auf Ergebnissen von Untersuchungen, in denen nachgewiesen werden konnte, dass durch die Anwesenheit von CO_2 die Auswirkungen von durch E–Beam gebildeten freien Radikalen reduziert wird (Baulmann et al., 1984; Scherzer, 1997). Scherzer erhöhte den Schutz der mit Elektronenstrahl behandelten Substanzen, in dem er diese mit einer lackähnlichen Schutzschicht überzog, die von bestimmten Insektenarten produziert wird. Diesen Effekt haben wir simuliert, indem die Versuche in CO_2 – Atmosphäre durchgeführt wurden. Weitere Studien über Bestrahlung von Sehnen mit E – Beam liegen in der Literatur nicht vor.

4.3.2 E-Beam- vs. Gamma-Sterilisation 25 kGy

In dem vorliegenden Versuchsansatz sollte die E-Beam- und Gamma Bestrahlung in bei einer Dosierung von 25 kGy hinsichtlich der Auswirkungen auf die Biomechanik von allogenen humanen Sehnentransplanate verglichen werden. Zusätzlich wurde die Sehnentransplanate noch bei 15 KGy E-beam untersucht Die Ergebnisse der E-Beam Bestrahlung zeigten bis zu einer maximalen Dosis von 25 kGy keine signifikanten Unterschiede in den biomechanischen Eigenschaften Viskoelastizität, Zyklische Elongation, Elongation, Steifigkeit und maximale Versagenskraft der BPTB-Transplanten gegenüber nativen Kontrollsehnen. Dem gegenüber zeigten die gammabehandelten Transplantate eine signifikant geringere maximale Versagenskraft im Vergleich mit nativen Kontrollsehnen bei 25 kGy. Eine Vielzahl an Studien konnte ebenfalls zeigen, dass eine Sterilisation mit Gammastrahlen ab einer Dosis

von 20 kGy zu einer deutlichen Reduktion der strukturellen Eigenschaften (Steifigkeit, Versagenskraft, Transplantatelongation) von Sehnenpräparaten führt (Fideler et al., 1994; Rappe et al., 2007; Sun et al., 2009). Fideler et al untersuchten die biomechanischen Eigenschaften von 60 humanen BPTB-grafts nach Gammabestrahlung zwischen 20 bis 40 kGy. Sie fanden eine signifikante Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften (Steifigkeit, Dehnung, maximale Versagenskraft) bei Gammawerten > 20 kGy. McGilvray et al. untersuchten den Einfluss von 15 kGy und 25 kGy Gammastrahlung auf die biomechanischen Eigenschaften von BPTB-Transplantaten am Tiermodell Schaf. Die Bestrahlungsdosis von 25 kGy führte zu einer signifikanten Verminderung der maximalen Versagenskraft (McGilvray et al., 2009).

In einer weiteren Studie berichteten Balsly et al. über eine statistisch signifikante Abnahme der Zugfestigkeit der Patellarsehnen-Transplantate nach Sterilisation mit 24,0-28,5 kGy Gamma Strahlung (Balsly et al. 2008). Curran et al. beobachteten weiterhin eine 20% Abnahme der Bruchlast der menschlichen Patellasehne bei einer Dosis von 20 kGy (Curran et al., 2004). Salehpour et al. fanden eine Senkung der Traglast und Endfestigkeit von 37% bzw. 47% gefunden (Salehpour et al., 1995). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit dem von uns untersuchten Transplantaten nach Gammastrahlung mit 25 kGy, wohingegen die mit 25 kGy E-Beam behandelten Transplanten keine signifikant verminderten biomechanischen Eigenschaften aufwiesen. Da der Versuchsansatz ansonsten identisch war, ist es naheliegend, dass der beobachtete Unterschied allein auf das unterschiedliche Bestrahlungsverfahren zurückzuführen ist.

4.3.3 E-Beam- vs. Gamma-Sterilisation 34 kGy

Da zur effektiven Virusinaktivierung Bestrahlungsdosen von über 25 kGy erforderlich sind (Pruss et al., 2002a), wurde in diesem Teilprojekt der Einfluss einer Gamma sowie einer E-Beam Hochdosisbestrahlung mit 34 kGy vergleichend untersucht. Nach 34 kGy Gammabestrahlung wiesen alle gemessenen biomechanischen Parameter (Steifigkeit, maximale Versagenskraft, zyklische Dehnung, Dehnungsdifferenz und Zyklische Elongation) gegenüber den Werten nativer BPTB-Transplantaten signifikant schlechtere Ergebnisse auf. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien der Literatur überein (Rasmussen et al., 1994; Fideler et al., 1994). Rasmussen et al. verglichen die Biomechanik von unbe-strahlten gefrorenen BPTB-Transplantaten und einer Bestrahlung mit 40 kGy. Die bestrahlten Präparate wiesen

signifikante Unterschiede in der Zyklischen Elongation und in der maximalen Versagenskraft auf. Fideler et al. kam in ihrer Studie mit 60 humanen BPTB-Präparaten und Gammabestrahlungen mit 30 und 40 kGy zu vergleichbaren Resultaten.

Nach 34 kGy E-Beam-Sterilisation waren die Werte der Steifigkeit gegenüber nativen Kontrollen identisch. Dehnungsdifferenz und Zyklische Elongation zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gegenüber nativem Sehnentransplantate. Signifikant geringer war die maximale Versagenskraft nach 34 kGy Bestrahlung mit E–Beam. Dies widerspricht den Ergebnissen von Seto et al., die nach Bestrahlung mit 50 kGy E-Beam keine signifikante Beeinträchtigung der maximalen Versagenslast fanden. Sie behandelten ihre Transplantate allerdings mit radioprotektiven Substanzen zur Radikalminimierung, was die Unterschiede zu unseren Ergebnissen erklären würde (Seto et al., 2009). Sowohl eine Gamma Sterilisation mit 34 kGy als auch mit 34 kGy E-Beam würden die Ansprüche an ein viruzides Verfahren erfüllen. Die Gamma Bestrahlung ist derzeit auf Grund unserer Ergebnisse und der Daten aus der Literatur für einen klinischen Einsatz in dieser Dosierung jedoch nicht anwendbar (Rappe et al., 2007; Sun et al., 2009). Die signifikant besseren Ergebnisse einer Hochdosis E-Beam Bestrahlung waren die Basis für die Genehmigung einer in vivo Studie mit dem Ersatz des VKB an einem etablierten Tiermodell (siehe 4.3.5).

4.3.4 Fraktionierte E-Beam-Sterilisation vs. E-Beam- und Gamma-Einzeldosis (34 kGy)

Ionisierende Strahlung führt dosisabhängig durch Beeinträchtigung der DNA- Replikation zu Zellschädigungen. In der Tumortherapie wird die fraktionierte Bestrahlung eingesetzt, um Gesamtdosen von 80 kGy ohne Schädigung gesunder Körperzellen anwenden zu können (Wannenmacher et al., 2006). Seit 10 Jahren wird von Onkologen die fraktionierte E-Beam Bestrahlung in der postoperativen adjuvanten Tumortherapie eingesetzt (Hehr et al., 2002). Auf Grund der Ergebnisse der Literatur und der geringeren Beeinträchtigung der Biomechanik von mit 34 kGy E-Beam bestrahlten humanen BPTB-Transplantaten in den vorhergehenden Testerien bestand der Versuchsansatz einer fraktionierten E-Beam-Sterilisation darin, dass diese Form der Bestrahlung signifikant geringere Schädigungen der Biomechanik induziert. Im Gegensatz zur Einzeldosis von 34 kGy wurde diese Strahlendosis auf 10-mal je 3,4 kGy fraktioniert. Verglichen mit den mit einer Einzeldosis von 34 kGy E-Beam oder Gamma behandelten Transplantaten zeigten die fraktioniert bestrahlten Sehnen signifikant bessere Werte für die Versagenslast, die Dehnungsdifferenz, das Zyklische

Elongation sowie die Elongation. Im Gegensatz zu einer Einzeldosisverabreichung kam es bei fraktionierter E-Beam-Sterilisation zu keiner signifikanten Verminderung der maximalen Versagenskraft im Vergleich zu nativen Kontrollsehnen. Eine mögliche Erklärung kann die im fraktionierten Prozess erzeugte geringere Radikaldichte sein. Die Wechselwirkung energiereicher Elektronen mit Materie gliedert sich in die physikalische, physikalisch-chemische und chemische Phase. In der physikalischen Phase bilden sich in Folge von Ionisations- und Anregungsprozessen angeregte Atome/Moleküle und Ionen/freie Elektronen. Diese führen in der physikalisch-chemischen Phase zu spezifischen Anregungs- und Ladungstransferreaktionen, die bevorzugt mit einer Radikalbildung durch homolytische Spaltung im gesamten bestrahlten Volumen enden. Diese Radikale induzieren komplexe chemische Reaktionen, die in der Regel gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeit, ablaufen. Das heißt, das Ergebnis der Bestrahlung (z. B. Vernetzung, Kettenspaltung oder Funktionalisierung) ist eine Überlagerung verschiedener gleichzeitig ablaufender Teilreaktionen. Deren Beitrag zum Gesamtergebnis ist von den konkreten Reaktionsbedingungen (z. B. der Radikaldichte) abhängig. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Inaktivierung der Viren durch direkte (d. h. die Erzeugung eines Defektes im Virus - Doppelstrangbruch) und indirekte Prozesse (d. h. Reaktionen der Viren mit strahleninduzierten Reaktionspartnern in deren chemischer Umgebung, z. B. Radiolyseprodukte des Wassers) erfolgen kann.

In den vier in vitro Testserien zeigten die biomechanischen Parameter der nicht bestrahlten humanen BPTB-Transplantate deutliche Unterschiede. Diese Differenzen könnten ihre Ursache in den Altersunterschieden der Spender haben. Das mittlere Alter der Spender in den Versuchsgruppen lag zwischen 45 und 65 Jahren. Eine statistische Verifizierung dieser Hypothese war nicht möglich, da die n-Zahlen in den Versuchsgruppen und die unterschiedlichen Versuchsansätze einen statistischen Beweis nicht zuließen. Aus diesem Grund sind Vergleiche mit anderen Studien hinsichtlich biomechanischer Parameter von nativen Sehnenpräparaten problematisch, da altersbezogene Angaben in der Literatur fehlen (Hoburg et al., 2010).

4.3.5 Tierexperimentelle Untersuchungen – 34 kGy E-Beam

Da die in vitro Versuche bei 34 kGy im Vergleich zur herkömmlichen Gammabestrahlung bessere Ergebnisse für die Elektronenbestrahlung zeigten, wurde eine tierexperimentelle

Überprüfung von mit 34 kGy E-Beamstrahlung behandelten Allografts im Vergleich zu nicht bestrahlten durchgeführt. Das Schaf wurde als Tiermodell in diesem Projekt verwendet, da es sich schon in diversen anderen Studien auf Grund seiner den Verhältnissen bei Menschen sehr ähnelnden Anatomie, Morphologie und den ähnlichen biomechanischen Eigenschaften sowie der problemlosen Haltung dieser Tiere als durchaus geeignet gezeigt hat (Radford et.al., 1996; Allen et al., 1998; Hunt el al., 2005, Weiler, 2001, 2002a). In einer vergleichen-den Studien des Remodelingprozesses konnte gezeigt werden, dass die auf zellulärer Ebene ablaufenden Vorgänge bei Mensch und Schaf durchaus vergleichbar sind und in ähnlichen Zeitdimensionen abzulaufen scheinen (Scranton et al., 1998). Außerdem beschäftigt sich die Arbeitsgruppe seit längerem mit diesem Modell, so dass auch auf Daten von vorangegangenen Studien zurückgegriffen werden kann. Daher wurden im Tiermodell auch freie Sehnen anstelle von BPTB-Transplantaten wie im in vitro Modell verwendet. Weiterhin ist aus der Literatur bereits bekannt, dass die Bestrahlung keinen negativen Einfluss auf die Knochenheilung hat, jedoch Erkenntnisse über den Einfluss der Bestrahlung auf die in-vivo-Einheilung des Sehnengewebes bis dato nicht vorliegen.

4.3.5.1 Biomechanische Ergebnisse

In dieser Studie fanden sich zwischen nativen autologen und allogenen Sehnen 6 Wochen nach der Operation keine signifikanten Unterschiede der biomechanischen Parameter. Dem gegenüber waren die Steifigkeit der mit 34 kGy E-Beam (Einzeldosis) bestrahlten Sehnen und die maximale Versagenskraft im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant erniedrigt. 12 Wochen postoperativ wiesen Steifigkeit und maximale Versagenskraft nicht bestrahlter Allografts gegenüber den Ergebnissen nach 6 Wochen signifikant bessere Resultate in Steifigkeit und maximaler Versagenskraft auf. Signifikant schlechtere Resultate und keine Verbesserung gegenüber den Ergebnissen nach 6 Wochen zeigten die mit 34 kGy bestrahlten Allografts 12 Wochen postoperativ. Da keine weiteren in vivo Studien existieren, die das Remodelling mittels E-Beam sterilisierter Transplantate untersucht haben, kann in folgenden nur ein Vergleich mit gammabehandelten Transplantaten erfolgen. Mae et al. untersuchten die Auswirkungen des Einfrierens bzw. Gefriertrocknens mit oder ohne anschließender Gammabestrahlungauf die biomechanischen Eigenschaften in einem Ratten-Patellarsehnen-Transplantationsmodell zum Zeitpunkt direkt nach Bestrahlung mit 25 KGy Gammastrahlung und während der 24-wöchigen Heilungsphase. Sie fanden initial verminderte biomechanische Eigenschaften bei den bestrahlten Transplantaten im Vergleich zu nur durch Frieren bzw.

Gefriertrocknung behandelten Sehnen. Im Laufe des Remodeling kam es aber zu einer Angleichung der Werte, so dass die Autoren gammabehandelte Transplantate als gute Möglichkeit einstuften, wenn darauf geachtet wird, das Transplantat während der frühen Phase nach der Transplantation < 4 Wochen zu schützen (Mae et al., 2003). Der Hauptunterschied zu der vorliegenden Studie liegt in der Bestrahlungsstärke. Da der schädigende Einfluss der Bestrahlung dosisabhängig ist, sind die unterschiedlichen Ergebnisse mit der geringeren Bestrahlungsdosis erklärbar. Auch klinische Studien fanden schlechtere Ergebnisse bei der Verwendung von gammabehandelten im Vergleich zu unsterilisierten Transplantaten. In einer klinischen Studie erfolgte der Ersatz des VKB mit nichtbestrahlten (n = 42) und mit 25 kGy Gamma bestrahlten Achillessehnen-Grafts (n = 33). 6 Monate nach der Operation wiesen ein Patient in der nichtbestrahlten Gruppe und 11 Patienten in der Gruppe mit bestrahlten Allografts eine erneute Ruptur auf (Fideler et al.,1994). Sun et al. kamen in einer klinischen Studie mit 32 bestrahlten BPTB-Grafts und 34 nichtbestrahlten Grafts zu vergleichbaren Fehlerraten (Sun et al., 2009).

4.3.5.2 Histologie

Die nachfolgenden Ergebnisse wurden durch eine Mitdoktorandin erhoben (Christine Broziat) und sind hier zur Ergänzung der biomechanischen Daten angefügt. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Bandremodelings zu 6 und 12 Wochen zeigten verstärkte Remodelingprozesse bei den E-Beam behandelten Transplantaten im Vergleich zu unbehandelten Allografts und Autografts. Sowohl die Zell- als auch die Gefäßdichte (Abb.44/ 45) zeigte sich bei den E-Beam behandelten Transplantaten während des gesamten frühen Bandremodelings z.T. signifikant erhöht im Vergleich zu unbehandelten Allografts und Autografts. Da in der Literatur eine Verminderung von biomechanischen Eigenschaften in Verbindung mit einer erhöhten Gefäßdichte immer wieder beschrieben ist, könnte dies eine mögliche Ursache für die biomechanischen Ergebnisse darstellen, wobei der Mechanismus dieser verstärkten Revaskularisierung noch unbekannt ist. Die Bestrahlung kann zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie VEGF oder PDGF oder entzündlichen Reaktionen führen (Petersen et al., 2003). Darüber hinaus könnten weitere Effekte wie Veränderungen in der Kollagen- Vernetzungsdichte möglich sein, was in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden muss.

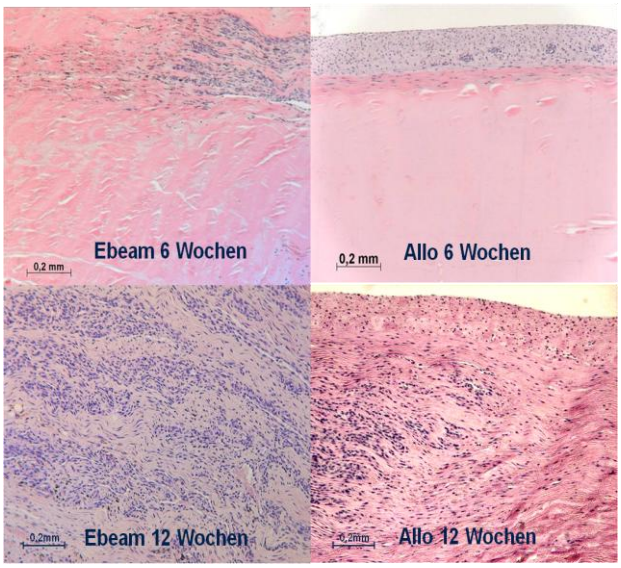


Abbildung 44: Gesamtzellzahl

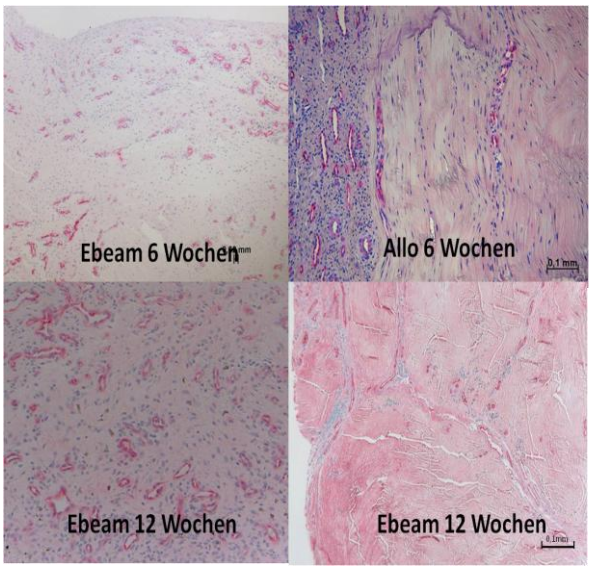


Abbildung 45: Gefäßdichte

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Für die Transplantation von allogenem Gewebe als VKB–Ersatz wird in Deutschland eine sichere Keiminaktivierung verlangt, um Graft-versus-Host-Infektionen zu verhindern. Insbesondere um klinisch relevante Viren sicher zu inaktivieren, sind Bestrahlungsdosen von mehr als 30 kGy erforderlich. Diese führen jedoch zu irreversiblen Schädigungen der allogenen Sehnentransplantate. Das Ziel der vorliegenden in vitro und in vivo Untersuchungen bestand daher darin, dosisabhängige Einflüsse der E-Beam- und Gamma Sterilisation auf die Biomechanik von allogenen und autologen Sehnen zu überprüfen. Erstmals wurde dabei eine fraktionierte E-Beam-Sterilisation untersucht, bei der die erforderliche minimale Dosis von 34 kGy in 10 Bestrahlungszyklen zu je 3,4 kGy appliziert wurde. Das Studiendesign für 4 in vitro Untersuchungen waren kontrollierte, randomisierte Laborstudien, in denen bestrahlte und unbestrahlte, tiefgefrorene BPTB-Präparate mit einer Breite von 10 mm nach 10 Tagen Konservierung (-70 ^{o}C ; CO_2) zyklischen Dehnungstests unterzogen wurden. Anschließend wurden die biomechanischen Eigenschaften getestet, wobei Steifigkeit, maximale Versagenskraft, Dehnung L_1–L_{200}, Dehnungsunterschiede und Zyklische Elongation analysiert wurden. Die Gruppenzuteilung von insgesamt 142 BPTB-Präparaten erfolgte in 4 Testreihen nach einem computergestützten Randomschema:

- E-Beam-Bestrahlung von 0 ,15 ,25 und 34 kGy an je 8 Präparaten,
- E-Beam-Bestrahlung von 0, 15, 25 und Gamma Bestrahlung mit 25 kGy an je 10 Präparaten,
- Unbestrahlte und 34 kGy E-Beam- und Gammabestrahlungan je 10 Präparaten,
- Unbestrahlte, 34 kGy Einzeldosis E-Beam- und Gammabestrahlungund 34 kGy E-Beam-Bestrahlung fraktioniert (10 x 3,4 kGy) an je 10 Präparaten.

Die in vitro Untersuchungen an humanen BPTB–Transplantate zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur signifikant schlechtere biomechanische Parameter bei einer Standard E-Beam-Bestrahlung mit 34 kGy sowie einer Gammabestrahlung mit 25 und 34 kGy im Vergleich zu nicht bestrahlten Sehnenpräparaten. Im Gegensatz dazu war die Biomechanik der fraktioniert mit 34 kGy E-Beam bestrahlten BPTB–Transplantate weitestgehend identisch mit den unbestrahlten Vergleichskontrollen. Eine mögliche Erklärung kann die im fraktionierten Prozess erzeugte geringere Radikaldichte sein.

Die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen an mit 34 kGy Einzeldosis E-Beam bestrahlten BPTB–Transplantate konnten durch in vivo Untersuchungen an implantierten Sehnen des M. flexor digitorum superficialis in 24 Merinomix – Schafen bestätigt werden. 6 Wochen und 3 Monate postoperativ wiesen die bestrahlten Ersatzplastiken des VKB signifikant schlechtere biomechanische Eigenschaften gegenüber nicht bestrahlten Sehnen auf. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Standard E-Beam Bestrahlung von BPTB–Transplantate mit 15 bzw. 25 kGy zu geringeren Beeinträchtigungen des Sehnengewebes als die herkömmliche Gammabestrahlung führt. Für die in Deutschland empfohlene Bestrahlungsdosis von ≥ 30 kGy sind nach den Ergebnissen der Literatur und der hier vorgelegten Untersuchungsergebnisse weder die Standard E-Beam- noch die Gammabestrahlung einsetzbar. Dahingegen zeigten die fraktioniert mit 10 x 3,4 kGy bestrahlten Transplantate keine signifikante Beeinträchtigung der biomechanischen Parameter in vitro. In vivo Untersuchungen müssen zeigen, wie sich das Remodeling und die biomechanischen Eigenschaften fraktioniert bestrahlter Sehnen darstellt und ob sich die positiven in vitro Ergebnisse bestätigen lassen. Daraus könnte sich ein Anstieg in der Bereitstellung mikrobiologisch sicherer und klinisch akzeptabler allogener BPTB-Transplantate ergeben und die klinische Versorgung von Patienten mit multiplen Bandverletzungen und Revisionseingriffen verbessert werden.

5. Summary and conclusions

In Germany, for the transplantation of allogenic tissue as a VKB substitute, a reliable microbiological deactivation is required to prevent graft-versus-host-infections. In particular for the inactivation of clinically relevant viruses, irradiation doses of more than 30 kGy are necessary. Nevertheless, these lead to irreversible impairments of allogenic tendon grafts. Hence, the aim of the present in vitro and in vivo studies was to examine dose-dependent influences of the E-beam and gamma sterilisation on the biomechanics of allogenic and autologous soft tissues. For the first time, a fractionated E-Beam-sterilization was examined, for which the necessary minimum dose of 34 kGy was applied in 10 irradiation cycles of 3.4 kGy each. The study design of four in vitro examinations entailed controlled randomised laboratory studies, in which irradiated and unirradiated, deep-frozen BPTB preparations having a width of 10 mm after 10 days of preservation (-70° C, CO_2) were submitted to cyclic distension tests. Afterwards, the biomechanical properties were tested, and stiffness, maximum failure strength, L_1-L_{200} distension, distension differences and creep behaviour were analysed. The group allocation of a total of 142 BPTB preparations took place in four test series after a computer-aided random scheme:

- E-beam irradiation of 0, 15, 25 and 34 kGy in 8 preparations,
- E-beam irradiation of 0, 15, 25 and gamma irradiation with 25 kGy in 10 preparations,
- Unirradiated and 34 kGy E-beam and gamma irradiation in 10 preparations,
- Unirradiated, 34 kGy single dose E-beam and gamma irradiation and 34 kGy E-beam irradiation fractionates (10 x 3.4 kGy) in 10 preparations.

In vitro examinations in human BPTB grafts showed – in accordance with the literature – significantly reduced biomechanical parameters with a standard significant E-beam irradiation using 34 kGy as well as a gamma irradiation with 25 and 34 kGy in comparison to unirradiated tendon preparations. In contrast, the biomechanics of the BTB transplants fractionated with 34 kGy E-beam irradiation were basically identical with the unirradiated comparative controls. A possible explanation might be the lower radical density generated in the fractionated process.

The results of the in vitro examinations of BPTB grafts irradiated with a 34 kGy single dose E-beam could be confirmed by in vivo examinations in implanted tendons of the M. flexor digitorum superficialis in 24 Merinomix-sheep. Six weeks and 3 months postal-surgically, the irradiated tendon transplants of the VKB exhibited significantly reduced biomechanical properties than those of the unirradiated tendons. To summarize, it can be ascertained that the standard E-beam irradiation of BPTB grafts with 15 or 25 kGy leads to lower interferences of the sinew tissue than the standard gamma irradiation does. For the irradiation dose of ≥ 30 kGy recommended in Germany, in view of the data in the literature and the examination results presented here, neither the standard E-beam nor the gamma irradiations are applicable. On the other hand the transplants irradiated with 10 x 3.4 kGy fractions showed no significant interference of the biomechanical parameters in vitro. In vivo examinations must show how the remodelling and the biomechanical properties of fractionated irradiated tendons are presented, and whether these can indeed be confirmed by positive in vitro results. From this, an increase in microbiologically safer and clinically more efficient allogenic BPTB grafts could arise, and the clinical care of patients with multiple ligament injuries and revision interventions could be improved.

7. Literaturverzeichnis

1. **Aglietti P, Buzzi R, D'Andria S et al**. Patellofemoral problems after intraarticularanterior cruciate ligament reconstruction. Clin Orthop Relat Res. 1993;**288**:195-204.
2. **Allen MJ, Houlton JE, Adams SB et al.** The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. Vet Surg. 1998;**27**:596-605.
3. **Almqvist KF, Jan H, Vercruysse C et al.** The tibialis tendon as a valuable anterior cruciate ligament allograft substitute: biomechanical properties. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2007;**15**:1326-30.
4. **Amiel D, Kleiner JB, Roux RD et al.** The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. J Orthop Res. 1986;**4**:162-172.
5. **Andersson C, Odensten M, Gillquist J.** Knee function after surgical or nonsurgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament: a randomized study with a long-term follow-up period. Clin Orthop Relat Res. 1991;**264**:255-63.
6. **Anderson MJ, Keyak JH, Skinner HB**. Compressive mechanical properties of human cancellous bone after gamma irradiation. J BoneJoint Surg Am. 1992;**74**:747-752.
7. **Awad HA, Boivin GP, Dressler MR et al**. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. J Orthop Res. 2003;**21**:420-431
8. **AWMF-**Leitlinien der Fachgesellschaft für Unfallchirurgie 2005. Leitlinie 012/005, www. AWMF-Leitlinien.de.
9. **Bach BR Jr, Aadalen KJ, Dennis MG et al.** Primary anterior cruciate ligament reconstruction using fresh-frozen, nonirradiated patellar tendon allograft: minimum 2-year follow-up. Am J Sports Med. 2005;**33**:284-92.
10. **Balsly CR.** Effect of low dose and moderate dose gamma irradiation on the mechanical properties of bone and soft tissue allografts. Cell Tissue Bank. 2008;**9**:289-298

11. **Barad, S.**, Cabaud, HE., Rodrigo, JJ. (1982) Effects of storage at – 80 °C as compared to 4 °C on the strength of rhesus monkey anterior cruciate ligaments. Trans Orthop Res Soc 7.
12. **Basset C.A.L. and Packard A.G. A** clinical assay of cathode ray sterilised bone grafts. Acta Orthop Scand. 1959;**28**:198-204.
13. **Baulmann Wl, Baulmann WLS** Hermann Wiederhold GmbH, assignee. Electron Beam Curing of Unsaturated Coating Materials. European patent 21.04.1982. 1984.
14. **Benedetto KP, Klima G.** Effect of the Hoffa fat pad on revascularization of the ruptured anterior cruciate ligament. A histologic study of the rabbit model. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 1986;**124**:262-5.
15. **Beynnon BD, Howe JG, Pope MH et al.** The measurement of anterior cruciate ligament strain in vivo. Int Orthop. 1992;**16**:1-12.
16. **Beynnon BD, Flemming BC, Labovich R, et al**. Chronic Anterior Cruciate Ligament Deficiency Is Associated With Increased Anterior Translation of the Tibia During the Transition From Non-Weight bearing to Weightbearing. J Orthop Res. 2002;**20**:332-337.
17. **Bonamo JJ, Fay C, Firestone T**. The conservative treatment of the anterior cruciate deficient knee. Am J Sports Med. 1990;**18**:618-23.
18. **Bonatus T, Alexander A.** Patellar Fracture and avulsion of the patellar ligament complicating arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction Orthopedics. 1991;**20**:770-774.
19. **Borden PS, Nyland JA, Caborn DN**. Posterior cruciate ligament reconstruction (double bundle) using anterior tibialis tendon allograft Arthroscopy. 2001;**17**:E14.
20. **Bosch U, Decker B, Kasperczyk W et al**. Biological aspects of long-term failure of autografts after cruciate ligament replacement. Archives of Orthopaedic & Trauma Surgery. 1989;**108**:368-72.
21. **Bosch U, Kasperczyk WJ.** Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction-a process of ligamentization? An experimental study in a sheep model. Am J Sports Med. 1992;**20**:558-66.

22. **Brückner H.** Eine neue Methode der Kreuzbandplastik. Chirurg. 1966;**37**:413-414.

23. **Buck BE, Malinin TI, Brown MD**. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Clin Orthop Relat Res. 1989;**240**:129-36.

24. **Bundesministerium für Gesundheit.** Gesetz über Qualität und Sicherheit von menschlichen Geweben und Zellen (Gewebegesetz). Bundesgesetzblatt I Jahrgang 2007 Nr. 35. 2007:1574-1594.

25. **Campbell DG, Li P**. Sterilization of HIV with irradiation: Relevance to infected bone allografts. Aust NZJ Surg. 1999;**69**:517-521.

26. **CDC, Centers for Disease Control and Prevention**. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. MMWR 1988; 37:597-599.

27. **CDC, Centers for Disease Control and Prevention**: Update: allograft-associated bacterial infections. MMWR 2002;**51**:207-210.

28. **Chang SK, Egami DK, Shaieb MD et al**. Anterior cruciate ligament reconstruction: allograft versus autograft. Arthroscopy. 2003;**19**:453-62.

29. **Chen CH, Chuang TY, Wang KC et al.** Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon autograft: clinical outcome in 4-7 years. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2006;**14**:1077-85.

30. **Christen B, Jakob RP**. Fractures associated with patellar ligament grafts in cruciate ligament surgery. J Bone Joint Surg Br. 1992;**74**:617-619.

31. **Claes, L.** Biomechanische Eigenschaften humaner Bänder. Aktuelle Probl Chir Orthop. 1983;**25**:12-19.

32. **Clarke JA**. HIV transmission and skin grafts. Lancet 1987; **8539**:983.

33. **Cohen B, Sekiya JK.** Allograft Safety in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. Am J Sports Med. 2007; **26**: 597-605.

34. **Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR et al.** Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. J Bone Joint Surg Am 1992;**77**:214-224.

35. **Cook SD, Salkeld SL, Prewett AB.** Simian immunodeficiency virus (human HIV-II) transmission in allograft bone procedures. Spine. 1995;20:1338-42.

36. **Curran AR, Adams DJ, Guill JL et al.** The biomechanical effects of low-dose irradiation on bone-patellar tendon-bone allografts. Am J Sports Med. 2004;**32**;1131-35

37. **Currey JD, Foreman J, Laketic I et al**. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. J Orthop Res. 1997;**15**:111-117.

38. **Daniel DM, Akeson WH, O`Connor JJ (eds)** Knee ligaments. Structure, function, injury and repair. 1990, 1 ed, Raven Press, New York, Tokio.

39. **DeLay BS, Smolinski RJ, Nicoletta RJ, et al.** Current trends in anterior cruciate Ligament reconstruction: results of a survey. 68th Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. San Francisco; 2001.

40. **De Vries PH, Badgley CE and Hartman JT.** Radiation sterilization of homogenous bone transplants utilizing radioactive cobalt. J. Bone Joint Surg. 1958;**40**:180-203.

41. **DiStefano V.** Anterior Cruciate Ligament reconstruction. Autograft oder Allograft? Clin Sports Med. 1993;**12**:1-11.

42. **Dustmann M, Schmidt T, Gangey I et al.** The extracellular remodeling of free-soft tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: a comparison study in a sheep model. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.2008;**16**:360-9.

43. **Dziedzic-Goclawska A, and Stachowicz W**. 1997. Sterilisation of tissue allografts. In: PhillipsG.O., vonVersenR., Strong D.M. and Nather A. (eds.), Advances of Tissue Banking, vol. 1.World Scientific, Singapore, pp. 261–321.

44. **Dziedzic-Goclawska A**. 2000. Application of ionising radiation to sterilise connective tissue allografts. In: Phillips G.O. (ed.), Radiation and Tissue Banking. IAEA, World Scientific, Singapore, pp. 57–99.

45. **Dziedzic-Goclawska A, Kaminski A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I et al.** Irradiation as a safety procedure in tissue banking. Cell Tissue Bank. 2005;**6**:201-219.

46. **Eggen BM, Nordbo SA:** Transmission of HCV by organ transplantation. N Engl J Med 1992;**326**:411.

47. **Engebretsen L, Benum P, Fasting O et al.** A prospective, randomized study of three surgical techniques for treatment of acute ruptures of the anterior cruciate ligament. Am J Sports Med. 1990;**18**:585-90.

48. **Falconiero RP, DiStefano VJ, Cook TM.** Revascularization and ligamentization of autogenous anterior cruciate ligament grafts in humans. Arthroscopy. 1998;**14**: 197-205.

49. **Farrington M, Wreghitt T, Matthews I, et al**. Processing of cardiac valve allografts: 2.Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties. Cell and Tissue Banking Int. 2002;**3:**91-103.

50. **Feagin J, Curl W.** Isolated tear of the anterior cruciate ligament. 5-year follow-up study. Am J Sports Med. 1976;**4**:95-100.

51. **Fideler BM, Vangsness CT Jr., Moore T, et al.** Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. J Bone Joint Surg Am. 1994;**7**6:1032-5.

52. **Fideler BM, Vangsness CT Jr., Lu B et al.** Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human. Am J Sports Med. 1995;**23**:643-46.

53. **Fink C, Hoser C, Hackl W et al.** Long-term outcome of operative or nonoperative treatment of anterior cruciate ligament rupture - is sports activity a determining variable? Int J Sports Med. 2001;**22**:304-309.

54. **Frank CB , Jackson DW.** The science of reconstruction of the anterior cruciateligament - current concepts review. J Bone Joint Surg Am. 1997;**79**:1556-76.

55. **Franz W, Ulbrich J.** Eine neue Technik zur Entnahme der Semitendinosussehne für den Kreuzbandersatz. Arthroskopie 2004;**17**: 104-107.

56. **Fulkerson JP, Langeland RH.** The central quadriceps tendon graft for cruciate ligament reconstruction. Operative Techniques in Orthopaedics. 1996;**6**:135-137.

57. **Garcia MM, Brooks BW, Stewart RB et al.** Evaluation of gamma radiationlevels for reducing pathogenic bacteria and fungi in animal sewage and laboratory effluents. Can J Vet Res. 1987;**51**:285-289

58. **Gesundheitsdirektion des Kantons Zürich:** Ruptur des vorderen Kreuzbandes: operative oder konservative Behandlung? http:www.gd.zh.ch/internet/gd/de/news2/news2009/medicalboar.ContentList.0006.Document.pdf) Bericht vom 30. Juni 2009.

59. **Gibbons MJ, Butler DL, Grood ES et al.**. Effects of gamma irradiation on the initial mechanical and material properties of goat bone-patellar tendon-bone allografts. J Orthop Res. 1991;**9**:209-218.

60. **Goertzen M, Dellmann A, Gruber J et al.** Anterior cruciate ligament allograft transplantation for intraarticular ligamentous reconstruction. Arch Orthop Trauma Surg. 1992;**111(5)**:273-279.

61. **Gonnermann J.** Ein neuer Ansatz bei der Sterilisation von allogenen Sehnentransplantaten zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes. 2009, Dissertation, Charité, Berlin.

62. **Goradia VK , Rochat MC , Kida M et al**. Natural history of a hamstring tendon autograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in a sheep model. Am J Sports Med. 2000;**28**:40-6.

63. **Gorschewsky O, Browa A, Vogel U et al.** Clinico-histologic comparison of allogenic and autologous bone-tendon-bone using one-third of the patellar tendon in reconstruction of the anterior cruciate ligament. Unfallchirurg. 2002;**105**:703-714.

64. **Gorschewsky O , Klakow A , Riechert K et al**. Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results. Am J Sports Med. 2005;**33**:1202-9.

65. **Gorschewsky O, Klakow A, Pütz A et al.** Clinical comparison of the Autologous Quadriceps Tendon (BQT) and the Autologous Patella Tendon (BPTB) for the reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2007;**35:**2118-25.

66. **Grieb TA, Forng RY, Stafford RE et al.** Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. Biomaterials. 2005;**26**:2033-42.

67. **Grieb TA, Forng RY, Bogdansky S et al.** High-dose gamma irradiation for soft tissue allografts: high margin of safety with biomechanical integrity. J Orthop Res. 2006;**24**:1011-18.

68. **Griffin LY, Agel J, Albohm MJ et al.** Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies. J Am Acad Orthop Surg. 2000; **8:**141-150.

69. **Guelich DR, Lowe WR, Wilson B.** The routine culture of allograft tissue in anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med. 2007;**35**: 1495-1499.

70. **Halls N.** The microbiology of irradiation sterilization. Med Device Technol. 1992;**3**:37-45.

71. **Hehr T, Budach W, Durst I et al.** Postmastectomy electron-beam-rotation irradiation in locally advanced breast cancer: prognostic factors of locvoregional tumour control. Strahlenther Oncol. 2002;**178**:624-632.

72. **Hernigou P, Gras G. Marinello et al.** Influence of irradiation on the risk of transmission of HIV in bone grafts obtained from appropriately screened donors and followed by radiation sterilization. Cell and Tissue Banking. 2000;**1**:279-289.

73. **Hesse E**. Über den Ersatz der Kreuzbänder des Kniegelenks durch freie Fascientransplantation. Verh Dtsch Ges Chir 1914; **43**: 188-189.

74. **Hiemstra H, Tersmette M, Vos AHV et al**. Inactivation of human immun-odefficiency virus by gamma radiation and its effect on plasma and coagulation factors. Transfusion 1991;**31**:32-39

75. **Hinterwimmer S, Engelschalk M, Sauerland S et al**. Operative vs. konservative Therapie der vorderen Kreuzbandruptur: eine systematische Literaturübersicht. Der Unfallchirurg. 2003;**106**: 374-379.

76. **Hoburg AT, Keshlaf S, Schmidt T et al.** Effect of Electron Beam Irradiation on Biochemical Properties of Patellar Tendon Allografts in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. Am J Sports Med 2010; **38**: 1134-40.

77. **Höher J, Tiling T**. Differenzierte Transplantatauswahl in der Kreuzbandchirurgie. Chirurg 2000; **71**: 1045-1054.

78. **Hoffmann MW, Wening JV, Apel R et al.** Repair and reconstruction of the anterior cruciate ligament by the "Sandwich technique". A comparative microangiographic and histological study in the rabbit. Arch Orthop Trauma Surg. 1993;**112**:113-20.

79. **Hübner M, Pannenbecker A, Pühler W** . Arzneimittelrecht – Geltungsbereich und Definitionen: Deutscher Ärzte-Verlag Köln; 2009.

80. **Hunt P, Scheffler SU, Unterhauser FN et al.** A model of soft-tissue graft anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. Arch Orthop Trauma Surg. 2005;**32**:881-91.

81. **Huston LJ, Greenfield ML, Wojtys EM**. Anterior cruciate ligament injuries in female athlete. Potential risk factors. Clin Orthop Relat Res 2000; **372**: 50-63.

82. **IAEA,** Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control. IAEA, Vienna, Austria .

83. **Jackson DW, Grood ES, Cohn BT, Arnoczky SP, Simon TM, und Cummings JF (1991)** The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament An experimental study in goats. J Bone Joint Surg Am 73(2).201-13

84. **Jackson DW , Grood ES , Goldstein JD et al.** A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. Am J Sports Med. 1993;**21**:176-85.

85. **Jackson DW, Corsetti J, Simon TM**. Biologic incorporation of allograft anterior cruciate ligament replacements. Clin Orthop Relat Res. 1996; 554:126-33.

86. **Johnson RJ, Beynnon BD, Nichols CE et al.** The treatment of injuries of the anterior cruciate ligament. J Bone Joint Surg Am. Jan 1992;74(1):140-151.

87. **Jomha NM, Borton DC, Clingeleffer AJ et al**. Long-term osteoarthritic changes in anterior cruciate ligament reconstructed knees. Clin Orthop Relat Res. 1999;**358**: 188-93.

88. **Jones KG.** Reconstruction of the anterior cruciate ligament: A technique using the central one-third of the patellar ligament. JBJS. 1963;**45**:925-932

89. **Junqueira, LC, Carneiro J, Kelley RO.** Histologie, 6. Aufl., 2005 Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

90. ***Kainer*** **MA, Linden JV, Whaley DN et al.** Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. N Engl J Med. 2004;**350**:2564-2571.

91. **Kartus J, Stener S, Lindahl S et al.** Factors affecting donor-site morbidity after anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone autografts. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1997;**5**:222-228.

92. **Kirkpatrick JS, Seaber AV, Glisson RR et al.** Cryopreserved anterior cruciate ligament allografts in a canine model. J South Orthop Assoc. 1996;**5**:20-9.

93. **Klose B, Gohs U, Bartel R. A.** process for the preparation of a package comprising a sterilized bulk of a drug substance, and a package comprising a sterilized bulk of a penicillin. International patent PCT/ DK2005/000527. December 8, 2005. World Intellectual Property Organization publication WO/2006/015603. February 16, 2006

94. **Kuhn MA , Ross G.** Allografts in the treatment of anterior cruciate ligament injuries. Sports Med Arthrosc. 2007;**15**:133-8.

95. **Kustos T, Balint L, Than P et al.** Comparative study of autograft or allograft in primary anterior cruciate ligament reconstruction. Int Orthop. 2004;**28**:290-293.

96. **Li CM, Ho YR, Liu YC:** Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: A case report. J Formosan Med Assoc 2001;**100**:350-351.

97. **Lindemann K**. Über den plastischen Ersatz der Kreuzbänder durch gestielte Sehnenverpflanzung. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 1950;**79**:316-334.

98. **Lomas RJ , Jennings LM , Fisher J et al**. Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts. Cell Tissue Bank. 2004;**5**:149-60.

99. **Luciani E.** Eine in-vitro-Studie über die Zugkräfte im vorderen Kreuzband und vorderen Kreuzband-Ersatz (Ligamentum patellae – Semitendinosus-Plastik). (http://e doc.ub.uni-muenchen.de/930/) Dissertation, LMU Mün-chen, 2003.

100. **Mae T, Shino K, Maeda A et al.** Effect of gamma irradiation on remodeling of tendon allograft. Clin Orthop Res. 2003;**414**:305-314.

101. **Malinin TI, Levitt RL, Bashore C et al.** A study of retrieved allografts used to replace anterior cruciate ligaments. Arthroscopy. 2002;**18**:163-70.

102. **Marrale J , Morrissey MC , Haddad FS**. A literature review of autograft and allograft anterior cruciate ligament reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2007;**15**:690-704.

103. **Marthy S, Richter M:** Human immunodeficiency virus activity in rib allografts. J Oral Maxillofac Surg 1998;56(4):474-6.

104. **Mayo-Robson AW.** Ruptured crucial ligaments and their repair by operation. Ann Surg. 1903;**37**:716-718.

105. **Mayr H, Becker R, Willkomm D et al.** Resultate der AGA-Instruktorenumfrage 2006 zur Verwendung von Allografts in der intraartikulären Chirurgie. Arthroskopie. 2007;**3**:246 - 253.

106. **McAllister DR, Joyce MJ, Mann BJ et al**. Allograft update: the current status of tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. Am J Sports Med. 2007;**35**:2148-58.

107. **McGilvray KC, Santoni BG, Turner S et al**. Effects of 60Co gamma radiation dose on initial structural biomechanical properties of ovine bone - patellar tendon – bone allografts. Cell and Tissue Bamking. 2009;**12**:89-98

108. **Menke W, Schneider T, Schmitz B et al.** Nachuntersuchungsergebnisse bei unbehandelter vorderer Kreuzbandruptur. Sportverl. Sportschad. 1990;**4**:169-74.

109. **Miyasaka KC, Daniel DM, Stone ML et al**. The incidence of knee ligament injuries in the general population. Am J Knee Surg. 1991;**4**:43-8.

110. **MMWR-CDC.** Update: Allograft associated bacterial infections – United States. **M**orbidity **M**ortality **W**eekly **R**eport-**CDC**. 2002;**51**:207-210.

111. **Muellner T , Kaltbrunner W, Nikolic A et al**. Shortening of the patella tendon after anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy. 1998;**14**:444-454.

112. **Noyes FR, Butler DL, Grood ES et al.** Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. J Bone Joint Surg Am. 1984;**66**:344-52.

113. **Odensten M, Lysholm J, Gillquist J**. Suture of fresh ruptures of anterior cruciate ligament. A 5-year follow-up. Acta Orthop Scand. 1984;**55**:270-272.

114. **Pelttari K, Winter A, Steck E et al.** Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. Arthritis Rheum. 2006;**54**:3254-66

115. **Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL et al.** Low risk of liver disease after tissue transplantation from donors with HCV. Lancet 1993;**341**:903-904.

116. **Petersen, W.; Tillmann, B.** Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. Anat Embryol (Berl) 1999:**200**:325-34.

117. **Petersen W, Laprell H.** Insertion of autologous tendon grafts to the bone: a histological and immunohistochemical study of hamstring and patellar tendon grafts. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2000;**8**:26-31.

118. **Petersen, W, Tillmann, B.** Anatomie und Funktion des vorderen Kreuzbandes. Orthopäde. 2002;**31**:710-718.

119. **Petersen W, Pufe T, Unterhauser F et al.** The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. Arch Orthop Trauma Surg. 2003;**123**:168-74.

120. **Petersen W, Zantop T.** Das vordere Kreuzband: Grundlagen und aktuelle Praxis der operativen Therapie. Deutscher Ärzteverlag,2009. ISBN 3-769-10562-1.

121. **Peterson RK, Shelton WR, Bomboy AL.** Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction: A 5-year follow-up. Arthroscopy. 2001;**17**:9-13.

122. **Prodromos C , Joyce B , Shi K**. A meta-analysis of stability of autografts compared to allografts after anterior cruciate ligament reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2007;**15**:851-6.

123. **Pruss A, Hansen A, Kao M et al.** Comparison of the efficacy of virus inactivation methods in allogeneic avital bone tissue transplants. Cell Tissue Bank. 2001a;**2**: 201-15.

124. **Pruss A , Baumann B , Seibold M et al.** Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. Biologicals. 2001b;**29**:59-66.

125. **Pruss A, Kao M.** Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. Biologicals. 2002a;**30**: 125-133.

126. **Pruss A, Perka C, Degenhardt P et al.** Clinical efficacy and compatibility of allogeneic avital tissue transplants sterilized with a peracetic acid/ethanol mixture. Cell Tissue Bank. 2002b;**3**:235-43.

127. **Pruss A , Göbel UB , Pauli G et al.** Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue transplants - a reliable sterilization method. Ann Transplant. 2003;**8**:34-42.

128. **Pruss A, Caspari G, Krüger DH et al.** Nukleinsäure-Amplifikationstest für HIV, HBV und HCV bei Gewebespendern: Sinnvoll oder überflüssig? Transfus Med Hemotherm. 2008;**35**:421-430.

129. **Radford WJP, Amis AA, Adams AC**. The ovine stifle as a model for human cruciate ligament surgery. Vet Comp Orthop Traumatol 1996;**9**:134-139.

130. **Rappe M , Horodyski M, Meister K et al.** Non-irradiated versus irradiated Achilles allograft: in vivo failure comparison. Am J Sports Med. 2007;**35**:1653-8.

131. **Rasmussen TJ, Feder SM, Butler DL et al.** The effects of 4 Mrad of gamma irradiation on the initial mechanical properties of bone-patellar tendon-bone grafts. Arthroscopy. 1994;**10**:188-197.

132. **Roberts TS, Drez D Jr, McCarthy W et al.** Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients. Am J Sports Med. 1991;**19**: 35-41.

133. **Rosenberg TD, Franklin JL, Baldwin GN et al.** Extensor mechanism function after patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med. 1992;**20**:519-25; 525-26.

134. **Rougraff B, Shelbourne KD, Gerth PK et al**. Arthroscopic and histologic analysis of human patellar tendon autografts used for anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med- 1993;**21**:277-84.

135. **Rubinstein RA Jr, Shelbourne KD, VanMeter CD et al.** Isolated autogenous bonepatellar tendon-bone graft site morbidity. Am J Sports Med. 1994;**22**:324-7.

136. **Rupp S, kohn D**. Ersatz des vorderen Kreuzbandes mit dem Patellarsehnentransplantat. Der Orthopäde. 2002;**31**:701-707.

137. **Russell A.D. 1999.** Radiation sterilization. A. Ionising radiation. In: Russell A.D., Hugo W.B. and Ayliffe G.A.J. (eds.), Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, pp. 675-687.

138. **Sakane M, Fox RJ, Woo SL et al**. In situ forces in the anterior cruciate ligament and its bundles in response to anterior tibial loads. J Orthop Res. 1997;15:285-93.

139. **Salehpour A, Butler DL, Proch FS et al.** Dose-dependent response of gamma irradiation on mechanical properties and related biochemical composition of goat bone-patellar tendon-bone allografts. J Orthop Res. 1995;**13**:898-906.

140. **Sauer R.** Strahlentherapie und Onkologie. Urban & Fischer bei Elsevier, 2002..

141. **Scheffler S.** Der Einfluss des Verankerungsniveaus und der Verankerungsmethodik von Rekonstruktionstechniken des Vorderen Kreuzbandes mit "Hamstring-Sehnen". Dissertationsschrift; 2002.

142. **Scheffler S, Scherler J , Pruss A et al.** Biomechanical comparison of human bonepatellar tendon-bone grafts after sterilization with peracetic acid ethanol. Cell Tissue Bank. 2005;**6**:109-15.

143. **Scheffler S, Trautmann S, Smith M et al.** No influence of collagenous proteins of Achilles tendon, skin and cartilage on the virus-inactivating efficacy of peracetic acid ethanol. Biologicals. 2007;**35**:355-9.

144. **Scheffler S, Schmidt T, Gangéy I et al.** Fresh-Frozen Free-Tendon Allografts Versus Autografts in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Delayed Remodeling and Inferior Mechanical Function During Long-term Healing in Sheep. Arthroscopy. 2008;**24**:448-458.

145. **Scheffler S**. Der Einfluss allogenen Spendergewebes und deren Sterilisations-Verfahren auf die biologischen Umbauprozesse und biomechanischen Eigenschaften von Ersatzplastiken des vorderen Kreuzbandes. Habilitationsschrift 2010.

146. **Scherzer T.** Electron beam curing of methacrylated gelatin. I: dependence of the degree of crosslinking on the irradiation dose. J Appl Polym Sci. 1997;**63**:1303-12.

147. **Schratt HE, Regel G, Kiesewetter B, Tscherne H:** HIV-Infektion durch kältekonservierte Knochentransplantate. Unfallchirurg 1996;**9**:679-684.

148. **Scranton PE, Lnzer WL, Ferguson MS et al.** Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularisation and ligamentization. Arthroscopy. 1998;**14**:702-716.

149. **Seto A, Gatt CJ Jr, Dunn MG.** Radioprotection of tendon tissue via crosslinking and free radical scavenging. Clin Orthop Relat Res. 2008;**466**:1788-95.

150. **Seto A, Gatt CJ, Dunn MG.** Improved Tendon Radioprotection by Combined Cross-linking and Free Radical Scavenging. 2009;**467**:2994-3001.

151. **Shelton WR.** Arthroscopic allograft surgery of the knee and shoulder: indications, techniques, and risks. Arthroscopy. Dec 2003;19 Suppl 1:67-69.

152. **Shino K, Kawasaki T, Hirose H et al.** Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog. J Bone Joint Surg Br. 1984;**66**:672-81.

153. **Shino K, Kimura T, Hirose H et al.** Reconstruction of the anterior cruciate ligament by allogeneic tendon graft. An operation for chronic ligamentous insufficiency. J Bone Joint Surg Br. 1986; 68: 739 - 46.

154. **Shino K, Inoue M, Horibe S et al.** Surface blood flow and histology of human anterior cruciate ligament allografts. Arthroscopy. 1991;**7**:171-6.

155. **Shino K, Nakata K, Horibe S et al.** Quantitative evaluation after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. Allograft versus autograft. Am J Sports Med. 1993,**21**:609-16

156. **Shutkin NM**: Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bone-bank bone. J Bone Joint Surg 1954;**36A**:160-162.

157. **Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL et al.** Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 1992;**326**:726-732.

158. **Sprössig M, Mücke H.** Die Virusdesinfektion durch Peressigsäure in Gegenwart von Alkoholen [Virus disinfection with peracetic acid presence of alcohol]. Wiss. Z. Humboldt-Univ., Math. -Nat. R. 1969;**18**:1171-1173.

159. **Stark, J.** Two cases of ruptured crucial ligaments of the knee joint. Edinburgh Med Surg 1850; **74** 267-269.

160. **Starke R , Hackensellner HA, von Versen R**. Experimentelle Untersuchungen zur Entkeimung von Transplantationsmaterial mit Peressigsaure. Z Exp Chir Transplant Künstliche Organe. 1984;**17**:254-8.

161. **Statistisches Bundesamt,** Zweigstelle Bonn, Krankheitskostenrechnung: Krankheitskosten 2002 für die Diagnose M23 (Binnenschädigung des Kniegelenks) in der Einrichtung Krankenhaus nach Geschlecht und Alter.

162. **Steckel H, Vadala G, Davis D et al.** The double-bundle technique for anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic overview. Scand J Med Sci Sports 2007;**17:** 99-108.

163. **Strobel MJ.** Arthoskopische Chirurgie Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokio; 1998.

164. **Suarez LS, Richmond JC.** Overview of procurement, processing, and sterilization of soft tissue allografts for sports medicine. Sports Med Arthrosc. 2007;**15**:106-13.

165. **Sun K, Tian S, Zhang J et al.** Anterior cruciate ligament reconstruction with BPTB autograft, irradiated versus non-irradiated allograft: a prospective randomized clinical study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2009;**17**:464-474.

166. **Tackman, W.** Das Binde- und Stützgewebe. In: Auxilium-Repetitorien der Histologie I. 1994: Berlin. p. 58-89.

167. **Towler DA, Gelbermann RH.** The alchemy of tendon repair: a primer fort he (S) mad scientist. J Clin Invest. 2006;**116**:863_66

168. **Tugwell BD, Patel PR, Williams IT et al.** Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. Ann Intern Med 2005;**143**: 648-54.

169. **Turner TC, Bassett CA, Pate JW et al.** Sterilization of preserved bone grafts by high voltage cathode irradiation. J. Bone Joint Surg. 1956;**38**:862–884.

170. **Unterhauser FN, Bail HJ, Höher J et al**. Endoligamentous revascularization of an anterior cruciate ligament graft. Clin Orthop Relat Res 2003;**414**:276-88.

171. **Vangsness CT, Garcia IA, Mills R et al.** Allograft Transplantation in the Knee: Tissue Regulation, Procurement, Processing, and Sterilization. Am J Sports Med. 2003;**31**:474-481

172. **Vangsness CT, Jr, Wagner PP, Moore TM et al.** Overview of safety issues concerning the preparation and processing of soft-tissue allografts. Arthroscopy. Dec 2006;**22**:1351-1358.

173. **Versen von R , Starke R.** The peracetic acid/low pressure cold sterilization--a new method to sterilize corticocancellous bone and soft tissue. Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe. 1989;**22**:18-21.

174. **Vincenti V, Cassano C, Rocchi M et al.** Assignment of the vascular groth factor gene to human chromosome 6p21.3. Circulation. 1996;**93**:1493-95

175. **Viola RW, Sterett WI, Newfield D et al**. Internal and external tibial rotation strength after anterior cruciate ligament reconstruction using ipsilateral semitendinosus and gracilis tendon autografts. Am J Sports Med. 2000;**28**:552-555.

176. **Vorlat P, Verdonk R, Arnauw G.** Long-term results of tendon allografts for anterior cruciate ligament replacement in revision surgery and in cases of combined complex injuries. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1999;**7**:322-327.

177. **Wannenmacher M, Debus J, Wenz F.** Strahlentherapie. Springer-Verlag, Berlin 2006.

178. **Weiler A, Peters G, Maurer J et al.** Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep. Am J Sports Med. 2001;**29**:751-61.

179. **Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A et al.** Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of Anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. Arthroscopy. 2002a;**18**: 113-123.

180. **Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ et al.** Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. Arthroscopy. 2002b;**18:**124-35.

181. **Weiler A, Scheffler S, Höher** J. Transplantatauswahl fur den primaren Ersatz des vorderen Kreuzbandes. Der Orthopäde. 2002c;**8**:731-740.

182. **Weiler A, Unterhauser FN, Bail HJ et al.** alpha-Smooth muscle actin isexpressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. J Orthop Res. 2002d;**20**:310-17.

183. **Welle A, Chiumiento A, Barbucci R:** Competitive protein adsorption on micro patterned polymeric biomaterials, and viscoelastic properties of tailor made extracellular matrices. Biomol Eng. 2007;**24:**87-91.

184. **Wilcke A.** Vordere Kreuzbandläsion. 2004, Steinkopff-Verlag, Darmstadt

185. **Wilson TW, Zafuta MP, Zobitz M. A** biomechanical analysis of matched bone-patellar tendon-bone and double-looped semitendinosus and gracilis tendon grafts. Am J Sports Med. 1999;**27**:202-7.

186. **Wittek A.** Kreuzbandersatz aus dem Lig. patellae. Schweiz Med Wochenschr 1935;**65:**103-104.

187. **Woo SL , Chan SS , Yamaji T.** Biomechanics of knee ligament healing, repair, and reconstruction. J Biomech. 1997;**30**:431-439.

188. **Yasuda K, Tsujino J, Ohkoshi Y et al.** Graft site morbidity with autogenous semitendinosus and gracilis tendons. Am J Sports Med. 1995;**23**:706-14.

189. **Yasuda K, Hayashi K.** Remodeling of Tendon Autograft in Ligament Reconstruction. In: Biomechanics. Functional Adaptation and Remodeling. 1997, Springer: Heidelberg, New York. p. 214-250.

190. **Yusof N.** Irradiation for sterilising tissue grafts for viral inactivation. Malays J Nucl Sci. 2000; **18:23**-35.

Anhang

Nomenklatur

ACL	Anterior Cruciate Ligament
AGA	Deutschsprachige Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie
AMG	Deutsches Arzneimittelgesetz
AMWHV	Arzneimittel- und Wirkstoff-herstellungsverordnung
ASA	American Society of Anesthesiologists
AOSSM	American Orthopedic Society for Sports Medicine
AP-Laxizität	anterior-posterior-Laxizität
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BPTB –Transplantat	Bone-Patellar-Tendon-Bone-Transplantat
CDC	Centers for Disease Control (USA)
cfu / ml	Colony forming units / ml
Co	Kobalt
Creep	Zyklische Elongation
DIZG …	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-Beam	Elektronenstrahlen-Sterilisation
ESR-Dosimeter	Elektronen-Spin-Resonanz-Dosimeter
FDA	Food and Drug Administration
HBV	Hepatitis-B Virus
HCV	Hepatitis-C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HKB	Hinteres Kreuzband
kGy	Kilo-Gray (erwärmt 1 l Wasser um 2,4^{o}C)

IAEA	International Atomic Energy Agency
L_{1-200}	Zyklische Belastungstests
LED	Light emitting diode
N	Newton (kg x m : s^2)
Ni	Nickel
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PES	Peressigsäure-Ethanol-Sterilisation
RNA	Ribonukleinsäure
SAL	Sterility Assurance Level
SGT	Semitendinosus- und Gracilissehnen-Transplantat
S-H	Schwefel-Wasserstoff-Verbindungen
S-S	Schwefel-Schwefel-Brücken
TPG-GewV	Transplantationsgesetz-Gewebeverordnung
$TCID_{50}$ /ml	Tissue culture infectionsdose (als dekadischer Logarithmus
TPG	Transplantationsgesetz
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VKB	Vorderes Kreuzband

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat Roland Lauster, dem Direktor des Instituts für Med Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin, für die Betreuung dieser Dissertation und die Überlassung des Themas. Herrn Prof. Dr. med. Axel Pruß, dem stellvertreten Direktor des Instituts für Transfusionsmedizin und Leiter der Gewebebank, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, Berlin, in dessen Abteilung ich diese Dissertation erstellen durfte und der mir bei der Konzeption und Erstellung dieser Arbeit jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand, danke ich im Besonderen.

Mein Dank gilt auch Herrn PD. Dr. med. Sven Scheffler und Frau Dr. med. vet. Tanja Schmidt für die Unterstützung während der Durchführung der experimentellen Untersuchungen. Christine Broziat danke ich für die Überlassung der histologischen Untersuchungsergebnisse aus ihren Forschungsresultaten. Außerdem möchte ich mich besonders bei Frank Schweiger, Sven Schurig und Bernd Schubarth aus der Gewebebank der Charité und bei Dr. Mark Smith aus dem DIZG Berlin für die Hilfe und Anregungen bei der Vorbereitung der Transplantate bedanken.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Forschungseinrichtung des Julius Wolff Instituts für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, insbesondere Dipl.-Ing. Jan Hoffmann, sowie den medizinisch-technischen Assistenten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Uwe Gohs, Fraunhofer Institut für Polymerforschung, Dresden, für die Beratung und Betreuung bei der Durchführung der Bestrahlungsexperimente in Dresden und Radeberg sowie dem gesamten Team der Gammaservice GmbH in Radeberg

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden gilt an dieser Stelle ganz großer Dank, da sie mich immer wieder mit Unterstützung und Hilfestellungen begleitet haben.

Publikationen des Promovenden

Hoburg AT, Keshlaf S, Schmidt T, Smith M, Gohs U, Perka C, Pruss A, Scheffler S. Effect of Electron Beam Irradiation on Biochemical Properties of Patellar Tendon Allografts in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. Am J Sports Med 2010; **38**: 1134-40.

Hoburg AT, Keshlaf S, Schmidt T, Smith M, Gohs U, Perka C, Pruss A, Scheffler S. Fractionation of high-dose electron beam irradiation of BPTB grafts provides significantly improved viscoelastic and structural properties compared to standard gamma irradiation. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc DOI 10.1007/s00167-011-1518-9.

Keshlaf S, Schmidt T, Hoburg AT, Smith MD, Gohs U, Scheffler S, Pruss A. Influence of an electron beam sterilization procedure on the early remodelling of allogeneic-free tendon grafts as a substitute for the front cruciate ligament. EATB 2010 Berlin 03-05.11.2010

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Salahedeen Keshlaf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Biomechanische Untersuchungen an humanen allogenen Sehnentransplantaten nach Elektronenstrahl- und Gammabestrahlung

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 18.10.2011 Unterschrift ……..